

分类号: Q965: Q966

单位代码: 10335

学 号: 21416101



Y3449279

浙江大学

硕 士 学 位 论 文



基于 CRISPR/Cas9 技术的果蝇基因组编辑研究

Study of CRISPR/Cas9 mediated genome editing in
Drosophila melanogaster

申请人姓名: 李萌琪

指导教师: 黄 佳 副教授

叶恭银 教 授

专业名称: 植物保护

研究方向: 昆虫基因组编辑

所在学院: 农业与生物技术学院

论文提交日期 二〇一七年一月

分类号: Q965; Q966

单位代码: 10335

学 号: 21416101



Y3449279

浙江大学

硕 士 学 位 论 文



基于 CRISPR/Cas9 技术的果蝇基因组编辑研究

Study of CRISPR/Cas9 mediated genome editing in

Drosophila melanogaster

申请人姓名: 李萌琪

指导教师: 黄 佳 副教授

叶恭银 教 授

专业名称: 植物保护

研究方向: 昆虫基因组编辑

所在学院: 农业与生物技术学院

论文提交日期 二〇一七年一月

基于 CRISPR/Cas9 技术的果蝇基因组编辑研究



论文作者签名: 李丽琪

指导教师签名: 黄佳

论文评阅人: 双向隐名评阅

答辩委员会主席:	傅 强	研究员	中国水稻研究所
委员:	李 飞	教 授	浙 江 大 学
	徐海君	教 授	浙 江 大 学
	徐红星	研究员	浙江省农业科学院
	黄 佳	副教授	浙 江 大 学

答辩日期: 二〇一七年三月四日

Study of CRISPR/Cas9 mediated genome editing in
Drosophila melanogaster



Author signature: Li Mengqi

Supervisor signature: Huang Jia

Thesis reviewer: Anonymous

Chair: Prof. Qiang Fu, China National Rice Research
Institute

Committeeman: Prof. Fei Li, Zhejiang University

Prof. Haijun Xu, Zhejiang University

Prof. Hongxing Xu, Zhejiang Academy of
Agricultural Sciences

Assoc.Prof. Jia Huang, Zhejiang University

Date of Oral Defence: 4 March, 2017

浙江大学研究生学位论文独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得 浙江大学 或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：李萌琪

签字日期：2017年3月21日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 浙江大学 有权保留并向国家有关部门或机构送交本论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权 浙江大学 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索和传播，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

学位论文作者签名：李萌琪

导师签名：黄佐

签字日期：2017年3月21日

签字日期：2017年3月21日

本研究承蒙

国家自然科学基金面上项目

(31572039)

国家重点基础研究发展计划“973”项目

(2013CB127600)

资助

目录

致谢	I
摘要	III
Abstract	V
第一章文献综述	1
1 引言	1
2 靶向基因组编辑技术原理	2
2.1 NHEJ 修复途径	2
2.2 HR 修复途径	3
2.3 其他修复途径	5
3 CRISPR/Cas 系统介导的基因组编辑技术	6
3.1 CRISPR/Cas 系统发展进程	6
3.2 CRISPR/Cas 系统分类	7
3.3 CRISPR/Cas 系统作用机制	8
3.4 CRISPR/Cas9 系统在果蝇基因组编辑中的应用	9
3.5 CRISPR/Cas9 系统的优势和局限	11
4 果蝇章鱼胺受体的研究	12
4.1 引言	12
4.2 章鱼胺受体的信号转导途径	13
4.3 果蝇章鱼胺受体的研究进展	15
5 展望	16
第二章 利用 CRISPR/Cas9 技术敲除果蝇 <i>white</i> 基因	17
1 引言	17
2 材料与方法	18
2.1 供试昆虫	18
2.2 主要质粒和菌株	18
2.3 主要试剂和仪器	19
2.4 CRISPR/Cas9 靶位点的选择	19
2.5 Cas9 mRNA 的制备	20
2.6 gRNA 的制备	22
2.7 pDCC6-W1, pDCC6-W2 载体制备	24
2.8 注射样品的配制	27
2.9 果蝇胚胎的显微注射	28
2.10 突变检测	29
3 结果与分析	30
3.1 <i>white</i> 基因序列分析和靶位点选择	30
3.2 Cas9 mRNA 和 gRNA 的制备	31
3.3 pDCC6-W1;pDCC6-W2 载体制备	32
3.4 G1 代突变检测	32
4 讨论	35
第三章 利用 tRNA-gRNA 技术实现多位点打靶 <i>CG18208</i> 基因	36
1 引言	36
2 材料与方法	37

2.1 供试昆虫.....37

2.2 *CG18208* 基因靶位点选.....37

2.3 Donor 质粒制备.....38

2.4 pCFD5-OA3 质粒制备.....40

2.5 果蝇胚胎显微注射.....42

2.6 *CG18208* 突变检测.....42

3 结果与分析.....44

3.1 *CG18208* CDS 序列分析和靶位点选择.....44

3.2 pCFD5-OA3 载体制备.....45

3.3 G0 代果蝇突变检.....46

3.4 HRMA 分析结果.....48

4 讨论.....50

总结.....51

1 本研究的创新之处.....51

2 本研究存在的问题.....51

3 今后的研究方向.....51

参考文献.....52

致谢

光阴如骏赶少年，三年前我第一次走进浙里紫金港，满怀憧憬与兴奋，开始新的征程，而今我的研究生学习生涯即将画上句号。三年的时间说短不长，回首过往我看到自己的学习、苦闷、成长与改变，很感激也很庆幸能有这样一段学习生活。我的硕士论文能够顺利完成，与老师、同学、家人、朋友的帮助和鼓励是分不开的。在这里，谨向所有帮助、支持过我的老师、同学、家人、朋友表达我最诚挚的谢意。

本论文的工作是在导师黄佳副教授和叶恭银教授的悉心指导下完成的。黄老师视野开阔、学识渊博、治学严谨，平常对学生的指导也是平易近人，对我科研素质的培养和日常生活产生深刻的影响。古人云，人生最大的遗憾是遇良师而不学，感谢黄老师不弃我资质愚钝、不求甚解，仍耐心教导，从课题选择、论文构架到细节修改，都给予无私的指导与帮助。叶老师求真务实的科研精神、兢兢业业的工作态度、幽默风趣的指导方式让人印象深刻，在我的科研和生活中自始至终都给予很多重要的指导。叶老师不仅对我的科研有很大帮助，更帮助我日益成熟待人接物方式。同时，也特别感谢姚洪渭老师和方琦老师对我的指导和帮助。师恩之大，不敢忘怀，在此由衷地感谢诸位老师三年来对我的指导与帮助，也祝愿各位老师生活顺心、科研如意！

另外，我要感谢昆虫生理生化实验室已毕业和还在奋斗的全体同学的帮助与关怀，感谢你们一千多个日夜的相伴，感谢你们无私的支持与鼓励。在这里祝愿大家都有似锦的前程。感谢昆虫所其他实验室老师和同学在科研生活中给予的帮助与便利。

我还要感谢我的父母，焉得谖草，言树之背。离家愈久，思念父母家乡的心情日益深切。养育之恩大于天，感谢父母开明，总是对我的选择给予最大的支持与理解。感谢老妹，给我带来关爱的同时也是我的开心果。

感谢胡波同学，虽远在北方，不常相见，感谢你始终不离不弃，感谢你对我所有的理解和宽慰。感谢我们可以携手走过这三年等待的时光。感谢欢乐多同学，

感谢你与我如此契合，科研之余还有与你的生活，非常感谢。感谢青年同学和室友同学，谢谢你们的陪伴。

最后，再次向三年来所有给我带来帮助的老师、同学、家人、朋友表达我真摯的谢意！同时，感谢各位百忙之中参与本论文审阅、评议的老师表达我最崇高的敬意！

李萌琪

2017年2月22日于紫金港

摘要

随着全基因组测序技术的不断发展,越来越多的昆虫物种全基因组测序工作完成。加之众多昆虫学工作者的努力,基因注释工作不断展开,大量的数据涌现在科研人员面前。如何深入研究和挖掘这些信息背后隐藏的基因功能信息成为问题的关键,解决这个问题的重要手段是靶向基因组编辑技术。CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) 系统是存在于细菌和古生菌中抵抗噬菌体 DNA 的免疫机制。在人们利用的第 II 类 CRISPR 系统中, Cas9 蛋白可以在一小段 gRNA 的引导下对基因组特定位点进行识别并切割,产生双链断裂,然后生物体通过不同的机制进行修复,从而实现靶向基因组编辑。本研究以模式昆虫黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (双翅目: Diptera; 果蝇科: Drosophilidae) 为研究对象,利用 CRISPR/Cas9 技术,对眼色决定基因 *white* 进行靶向编辑,并利用 tRNA-gRNA 技术实现多位点打靶 *CG18208* 基因。

1 利用 CRISPR/Cas9 技术敲除果蝇 *white* 基因

从 flybase (<http://flybase.org/>) 上下载得到果蝇 *white* 基因 CDS 序列,分析其内含子与外显子区域。通过 flycrispr 网站的 Flycrispr Optimal Target Find (<http://flycrispr.molbio.wisc.edu/tools>) 查找并选择合适的靶位点。体外转录得到 Cas9 mRNA 和 gRNA,按照 Cas9 mRNA 300ng/ μ L、gRNA 40 ng/ μ L 的浓度注射到红眼野生型果蝇 Canton-S 早期胚胎生殖细胞系中。得到的 G0 代果蝇通过自交得到 G1 代,并未观察到白眼突变,分析可能是操作过程中 RNA 降解所致。接下来利用 pDCC6 质粒自带的启动子在体内同时转录得到 Cas9mRNA 和 gRNA。将制备好的质粒以 400ng/ μ L 的浓度注射到果蝇早期胚胎中,成功在 G1 代观察到白眼突变表型。通过分子检测到 G1 代在相应的靶位点产生碱基的缺失。

2 利用 tRNA-gRNA 技术实现多位点打靶 *CG18208* 基因

从 flybase (<http://flybase.org/>) 上下载得到果蝇编码章鱼胺受体的 *CG18208* 基因 CDS 序列,分析其含子与外显子区域。通过 flycrispr 网站的 Flycrispr Optimal Target Find (<http://flycrispr.molbio.wisc.edu/tools>), 查找并选择合适的靶位点。将 4 个 gRNA 同时克隆到 pCFD5 质粒中得到 pCFD5-OA3 质粒,其中利用单一 U6:

3 启动子启动转录得到一个长的 RNA 转录本, 通过生物体内在的 tRNA 精确剪切系统, 最后得到独立的 4 个 gRNA。另外制备含有两个 1kbp 同源臂的 OA3-donor 质粒, 该质粒含有 GAL4 和 mini-white 元件, 预计这两个元件将定点插入到 *CG18208* 靶位点。将这两个质粒以 pCFD5-OA3 400 ng/ μ L、OA3-donor 250 ng/ μ L 的浓度注射到生殖细胞系特异表达 Cas9 的转基因果蝇中。得到的 G0 代果蝇与三号染色体 TM3/TM6 平衡子果蝇杂交, 最终我们通过 Sanger 测序、TIDE 分析和 HRMA 方法检测到靶位点突变。

关键词: 果蝇, CRISPR/Cas9, *white* 基因, *CG18208* 基因, 章鱼胺受体, tRNA-gRNA。

Abstract

With the development of the whole genome sequencing, a growing number of insect species' whole genome sequencing work is finished. In addition to the efforts of so many entomologists, gene annotation work is continuous developing, a large amount of data emerging in front of people. How to study and excavate the gene function hidden behind these information become the key point. An important means of solving this problem is genome editing. CRISPR (Clustered Regularly Interspaced short Palindromic Repeat) system is an immune mechanism to resist of phage DNA in bacteria and archaea. In type II CRISPR system, the Cas9 protein guided by a short period of gRNA to identify and cut the specific genome sequence, result in double strand breaks(DSBs). The gRNA recognizes a 20-nt target sequence next to a trinucleotide NGG protospacer adjacent motif(PAM), also the gRNA sequence are the same as 20-nt target sequence. After generating DSBs, organisms will repair the double strand breaks through different way and finally achieve targeted genome editing. In this study, we chose model insect fruit fly *D. melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). Targeted editing the *white* gene which deciding the eye color of drosophila using CRISPR/Cas9 system and multiplex editing *CG18208* gene which codoning octopamine receptor using tRNA—gRNA architecture.

1. Mutagenesis of drosophila white gene using CRISPR/Cas9

We downloaded CDS sequences of fly *white* gene from flybase (<http://flybase.org/>). Analysed it's introns and exons. found and selected the appropriate site through flycrispr Optimal Target Find on flycrispr website (<http://flycrispr.molbio.wisc.edu/tools>). Then we in vitro transcribed Cas9 mRNA and gRNA. Mixed the Cas9 mRNA and gRNA at the concentration of 400ng/ μ L and 40 ng/ μ L, and injected into early embryonic germ line cells of wild-type Canton-S flies. We failed to observe white eye type in G1 flies. This may be caused by RNA degradation during the process of operation. Next, we clone the gRNA into pDCC6

vector, express Cas9 and gRNA with this single plasmid. After injected this single plasmid into flies' early embryonic germ lines, we observed white eye mutant from G1 flies. Sequencing of mutant region observed indel at targeted sites.

2. Multiplex targeting *CG18208* gene using tRNA–gRNA system.

We download CDS sequences of fly *CG18208* gene from flybase (<http://flybase.org/>). Analysed it's introns and exons. Then found and selected the appropriate site through flycrispr Optimal Target Find on flycrispr website (<http://flycrispr.molbio.wisc.edu/tools>). Next we cloned four different gRNAs into pCFD5 plasmid, making the four gRNA flanked by tRNA. The four gRNAs could be efficiently produced from a single synthetic gene with the tRNA–gRNA architecture after precise excision of transcripts in vivo by the endogenous RNases. In addition we prepare a donor plasmid which have Gal4 and min-whitecontaining two 1 kbp homologous arms. We expected that this two elements will inserted into targeted site at *CG18208*. Next, we mixed the pCFD5-OA3 and donor plasmid at the concentration of 400 ng/μL and 250 ng/μL, and injected them into early embryonic germ line cells of 51323 flies. The G0 flies were outcrossed to TM3/TM6 flies of opposite sex. Finally, we detected mutant at targeted site through Sanger sequencing, TIDE analysing and HRMA.

Key words: *D. melanogaster*, CRISPR/Cas9, *white* gene, *CG18208* gene, dopamine receptors, tRNA-gRNA.

第一章文献综述

1 引言

随着全基因组测序技术的不断发展与完善,越来越多的昆虫物种全基因组测序工作完成,如黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)(Myers *et al.*, 2000)、金小蜂(*Nasonia*)(Werren *et al.*, 2010)、家蚕(*Bombyx mori*)(Xia *et al.*, 2009)、赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)(Richards *et al.*, 2008)、小菜蛾(*Plutella xylostella*)(You *et al.*, 2013)、褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)(Xue *et al.*, 2010)、飞蝗(*Locusta miratoria*)(Hou *et al.*, 2015)、大斑蝶(*Danaus plexippus*)(Stensmyr *et al.*, 2011)等。加上众多昆虫学工作者的努力,基因注释工作的不断完成,大量的信息涌现在研究人员面前。如何从这些海量的基因组信息中获得有关基因功能的有效信息成为关键,解决这个问题的重要手段是靶向基因组编辑技术(Targeted genome editing)。

靶向基因组编辑技术又称基因打靶技术(Gene targeting)是上世纪 80 年代发展起来的一种分子生物学技术。该技术最初由 Mario Capecchi 提出,他突破性的将与细胞内序列同源的外源 DNA 导入细胞内,利用细胞内在的同源重组机制,成功将外源基因整合到基因组特定位点,从而改变了特定基因的表达与功能(Capecchi, 1989)。该技术证明了靶向基因组编辑技术广泛应用的巨大潜力。凭借这一技术, Mario Capecchi 本人获得了 2007 年度诺贝尔生理学或医学奖。为了广泛并且高效的在生物体内进行基因组编辑工作,科研工作者已经研制了四种主要的人工改造 DNA 结合蛋白分别是:源自微生物的 Mega 核酸酶(Smith *et al.*, 2006);基于原核生物转录因子的锌指核酸酶(Zinc-Finger Nucleases, ZFNs)(Urnov *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2007);源自黄单胞杆菌的转录激活因子样效应物蛋白(Transcription Activator-like Effector Nucleases, TALENs)(Christian *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2011; Boch *et al.*, 2009; Moscou and Bogdanove, 2009),以及最近发展起来的第 II 类 CRISPR 系统中 RNA 引导的 DNA 核酸酶 Cas9 蛋白(Cong *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013)。尽管靶向基因组编辑技术的发展历史并不长,但已经被应用在生物学各个领域,尤其是最近基因组编辑技术的发展更是将生物学研究推上一个新的纪元,全世界的科学家应用这项技术已经对数以万计的基因进行了功

能研究。与传统技术相比,科研工作者可以直接在基因组内源环境中调控基因的表达和功能,而不需要将它们克隆出来。

2 靶向基因组编辑技术原理

靶向基因组编辑主要依赖自然发生的同源重组进行,然而正常情况下同源重组方式介导的基因组编辑发生频率极低(10^{-8} - 10^{-9})(Capecchi, 1989),外源基因通常通过随机整合的方式插入到基因组的某一位点(Thomas *et al.*, 1986)。二十世纪九十年代的研究发现,DNA 分子发生双链断裂能够引发生物体修复损伤,同时引入碱基的突变、缺失或插入,从而大大提高靶向基因组编辑效率(Rudin *et al.*, 1989; Plessis *et al.*, 1992; Rouet *et al.*, 1994; Choulika *et al.*, 1995; Bibikova *et al.*, 2001; Bibikova *et al.*, 2003)。因此,靶向基因组编辑技术的关键是在目标位点产生双链 DNA 断裂(Double Strand Breaks, DSBs),之后生物体对双链断裂进行修复,从而实现不同类型的基因定向修饰。真核生物体内 DNA 双链断裂的修复机制主要有同源重组修复途径(Homologous Recombination, HR)和非同源末端接合修复途径(Non-Homologous End Joining, NHEJ)。

2.1 NHEJ 修复途径

NHEJ 修复通路是真核生物 DSBs 修复的主要途径,在几乎所有的 DSBs 修复缺陷的突变体克隆分析中都发现缺乏 NHEJ 修复(Weaver, 1995),该通路从细菌到哺乳动物高度保守。NHEJ 修复过程中,DSBs 在一些 DNA 修复元件作用下直接修复,不需要同源染色体存在。该修复途径的主要特点是突变随机引入,即在 DSBs 处随机引入 DNA 的插入和缺失。更为重要的是 NHEJ 修复方式还能够连接较远的两处 DSBs,这两处 DSBs 可以在同一条染色体上,也可能在不同的染色体上。因此,NHEJ 也是造成染色体缺失和易位的分子基础(芦广庆, 2016)。NHEJ 发生在细胞循环的任何时期,但通常主要发生在 G1 期。参与该过程的主要蛋白有包含催化亚基的 DNA 依赖蛋白(DNA-PK)、Ku70/Ku80 异质二聚体以及 DNA 连接酶 IV/XRCC4 复合体等。该途径经过以下四个主要步骤完成:首先,Ku 蛋白识别并结合在 DNA 断裂处,形成 DNA-Ku70/Ku80 复合体。由于 Ku 蛋白的特殊结构,使得它可以和任何类型的 DNA 末端结合(Mimori and Hardin,

1986)。接下来, Ku 蛋白招募 DNA 依赖性蛋白激酶的催化亚基(DNA-PKcs), Ku 蛋白与 DNA-PKcs 结合成 DNA-PK 复合体,这一复合物使 DNA 末端相互靠近并且正确排列(Uematsu *et al.*, 2007; DeFazio *et al.*, 2002)。第三步, 多种 DNA 末端修复酶, 如 PNKp、PolX 家族、Arteins 等聚集到 DNA 双链末端, 对 DSBs 进行剪切、合成等加工处理(Burma *et al.*, 2006)。最后, 由 DNA 连接酶 IV/XRCC4 复合体将 DNA 双链末端进行连接(Lu *et al.*, 2016)。由于 DNA 断裂末端结构的多样性, 加工和连接过程通常是协同发挥作用而不是完全分开进行的(Dudasova *et al.*, 2004)。尽管 NHEJ 修复途径在哺乳动物细胞中发生的频率很高, 但是由于它不需要完整的同源模板的存在就可以修复, 是一种易于出错的修复方式(Bibikova *et al.*, 2002)。

现在有争论存在一种精确的 NHEJ 修复方式, 这种精确 NHEJ 修复方式需要肿瘤抑制基因 *Brcal* 的存在, 这种修复方式能够保护基因组的完整性(Bau *et al.*, 2004)。*Brcal* 蛋白可能在精确 NHEJ 修复途径中发挥保护 DNA 末端免受核酸酶过分修饰的作用(Zhuang *et al.*, 2006)。目前还有很多证据表明, NHEJ 修复通路本身也是需要 *Brcal* 基因存在的(Bau *et al.*, 2005)。另外 ATM/Chk2 调节的信号通路是对精确 NHEJ 修复途径起关键作用(Smith *et al.*, 2010)。

2.2 HR 修复途径

HR 修复方式只发生在 DNA 复制过程中, 并且只在细胞周期的 S 后期到 G2 期发生作用(Branzei and Foiani, 2008)。HR 修复途径是对 DSBs 的精确修复, 需要姊妹染色单体的存在才能进行。在低等真核生物如酵母中, HR 是主要的 DSBs 修复途径。由于高等真核生物体内有大量的重复 DNA 序列, 以 HR 修复途径进行 DSBs 修复就会变得异常混乱, 因此自然状态下高等真核生物体内 HR 修复方式发生频率非常低。HR 修复方式的分子机制最早在细菌(*E.coli*)和酵母(*S. cerevisiae*)中得到研究(黄敏, 2007)。相对于 NHEJ 修复途径, 真核生物 HR 修复途径要复杂得多(Szostak *et al.*, 1983)。大体分为以下三个步骤: (1) MRN 复合体(MRE11/Rad50/NBS1 complex)识别并结合在双链断裂的区域。MRN 复合体可以招募一些蛋白, 对 DNA 断裂末端进行 5'到 3'方向的切割加工, 暴露 3'单链 DNA 末端, 稳定并保护 DNA 单链、防止形成二级结构 (Jackson, 2002)。(2) DNA 合

成链的入侵。众多 RPA 蛋白结合到加工过的 DNA 单链上，促进 DNA 链入侵，这也是 HR 修复的关键步骤。DNA 合成链的入侵是 RAD51 依赖性的，Rad51 是大肠杆菌 RecA 在真核细胞中的同源物质，具有 DNA 依赖性的 ATPase 活性，单链 DNA 能够通过 Rad51 与大量结合在 DNA 链上的 RPA 蛋白竞争，从而替换 RPA 蛋白，形成核蛋白细丝(Shinohara *et al.*, 1992)。(3) Holliday 交叉的形成和解离。Rad51 引导核蛋白丝识别 DNA 模板并催化 DNA 链的配对、延伸、形成 Holliday 联结，后者在核酸酶和连接酶的作用下形成完整的 DNA 分子(Holliday, 2007)。

尽管两种 DSBs 修复方式在哺乳动物细胞内都会发生，但是细胞对这两种修复方式的选择主要依赖细胞周期、细胞类型等因素。由于 HR 修复方式需要同源染色单体的存在且只能发生在 S 期和 G2 期。因此，HR 修复方式只发生在分化细胞的 S 期和 G2 期；而 G0 期、G1 期的细胞以及分化完全的细胞中 DSBs 的修复方式则是 NHEJ 修复。另一方面，有研究认为 NHEJ 修复方式是在细胞发生损伤时的快速修复机制，待细胞度过危险期后，再进行精确的 HR 修复(Rothkamm *et al.*, 2003)。图 1.1 表示两种不同修复方式的过程示意图以及参与两种修复方式的主要酶。

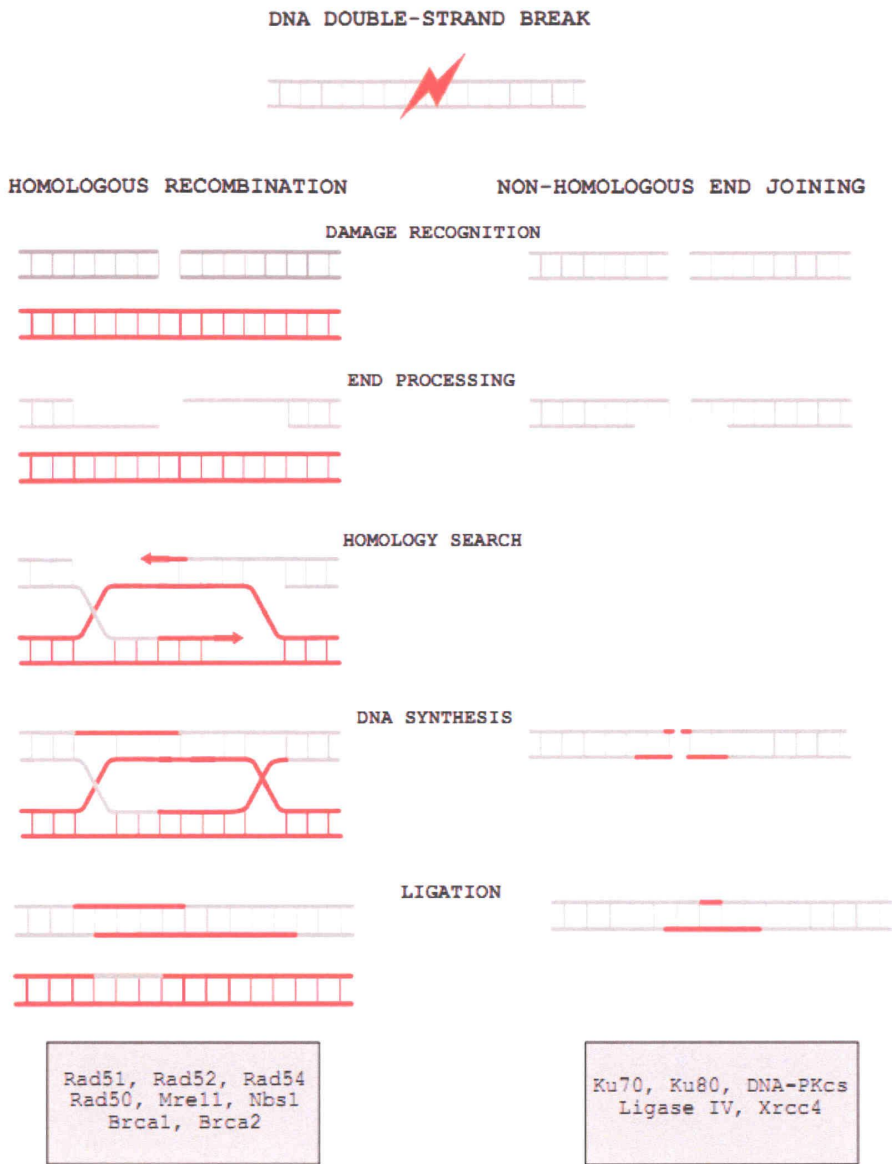


图 1.1 哺乳动物细胞 NHEJ、HR 修复途径

Fig 1.1 NHEJ and HR mediated DNA double strand breaks repair in mammalian cells

注：图片来源(Houtgraaf *et al.*, 2006)

2.3 其他修复途径

除了 NHEJ 和 HR 修复方式，哺乳动物细胞内还存在另外一种主要的 DSBs 修复方式为 SSA(Single-Strand Annealing)，这种修复方式被认为是 HR 修复通路

的分支。在酵母中的实验发现, HO 核算内切酶可以在 *ura3* 序列之间产生双链断裂。但是通过 southern 杂交检测不到交互产物, 表明可能是一个以前没有观测到的过程。尽管 SSA 修复方式不会形成 Holliday 联结, 该通路同样需要同源染色单体的存在来使 DNA 重新联合在一起。与 HR 修复方式一样参与该过程的酶主要也包括 hRad50、hMre11 和 Nbs1。其中 hMre11 具有 3'-5'核酸外切酶活性, 能够切除 DNA 末端断裂或者错配碱基, 从而使单链 DNA 短末端暴露出来(Stewart *et al.*, 1999)。研究表明, SSA 修复通路主要是对重复 DNA 序列的损伤起作用(Karren, 2000)。当生物体内产生 DSBs 后, 首先断裂的 DNA 会寻找短的同源序列, 如果同源染色单体存在, 它就会侵入同源染色单体, 不是形成 Holliday 联结, 而是通过 SSA 修复方式修复末端断裂。单链在 DNA 断裂处产生并且向重复序列延伸, 因此互补链可以通过退火相互结合。如果几个重复序列同时存在, 通常偏向于靠近 DSBs 的重复序列。SSA 通常可以造成染色体的缺失、插入和易位等。实际上酵母中非同源染色体之间的易位是经常发生的(Haber and Leung, 1996)。自然界中存在非常多的 DNA 重复, 因此 SSA 很可能也是普遍存在的一中 DSB 修复机制。

3 CRISPR/Cas 系统介导的基因组编辑技术

3.1 CRISPR/Cas 系统发展进程

1987 年日本大阪大学的 Nakata 及其同事最早在研究大肠杆菌碱性磷酸酶的时候发现, 在该基因的附近存在着一小段独特的 DNA 重复序列, 中间以特殊的间隔序列隔开(Ishino, 1987)。随着基因组测序与解析工作的不断完成, 越来越多的细菌(bacteria)和古细菌(archaea)中发现了这种独特的 DNA 重复序列。研究发现, 至少百分之四十的细菌以及百分之九十的古生菌体内存在这种重复序列(Mojica *et al.*, 2000)。2002 年美国科学家 Jansen 将这种重复序列命名为 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Shortpalindromic Repeats)(Jansen *et al.*, 2002)。但是人们仍然不知道如此多微生物种内存在的这种特殊重复序列的作用是什么。

一直到 2005 年, 三个生物信息学团队先后发表文章, 称 CRISPR 序列与噬

菌体内序列高度同源,暗示 CRISPR 序列可能与细菌和古生菌抵抗外源遗传物质的免疫机制有关。2006 年, Makarova 首次提出 CRISPR 的作用机制类似于真核生物的 RNA 干扰(Makarova *et al.*, 2006)。2007 年, Barrangou 则明确解释 CRISPR 是细菌和古生菌在长期进化过程中获得的抵抗外界遗传物质的免疫保护系统(Barrangou *et al.*, 2007)。至此, CRISPR 受到越来越多科研工作者的关注。随后 Emmanuelle Charpentier 与 Jennifer Doudna 做了大量基础研究, 发现从嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)或者酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)纯化的到的 Cas9 蛋白可以在 crRNA 的引导下体外对 DNA 进行切割。同时他们强调了 Cas9 蛋白作为真核生物基因组编辑工具的可能性(Jinek *et al.*, 2012; Gasiunas *et al.*, 2012)。

接下来, 麻省理工学院的张峰和 George Church 教授以及全世界其他实验室陆续揭示了 CRISPR/Cas9 技术在真核生物基因组编辑中的巨大应用价值(Cong *et al.*, 2013)。截至目前, 全世界众多实验室已经利用 CRISPR 技术实现多种生物的基因组编辑, 其中包括诸多的昆虫物种如黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)(Gratz *et al.*, 2013)、家蚕(*Bombyx mori*)(Wang *et al.*, 2013b)、赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)(Gilles *et al.*, 2015)、棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)(Wang *et al.*, 2016)、蝗虫(*Locusta migratoria manilensis*)(Li *et al.*, 2016)、小菜蛾(*Plutella xylostella*)(Huang *et al.*, 2016)等。

3.2 CRISPR/Cas 系统分类

Cas 基因序列有很高的多样性, 且功能丰富。依据 CRISPR/Cas 系统的工作机制, 通常将其分为三种类型: I、II、III 类(Haft *et al.*, 2005)。I 类系统存在于古生菌和细菌中, 包含的 Cas 蛋白最多, 有 6 个, 其中最具有代表性的 Cas3 具有解旋酶和核酸酶的功能, 是干扰阶段的主要作用酶类。多个 Cas 蛋白能够与 crRNA 共同结合形成 CRISPR 相关病毒防御复合物(CRISPR Associated Complex for Antivirus Defense, CASCAD)来发挥作用。III 类系统大多数存在于古生菌中, 在细菌中很少发现(Jansen *et al.*, 2002)。这类系统的主要 Cas 蛋白是 Cas10 蛋白, 同样具备 RNA 酶活性和 CASCAD 功能。目前发现的 III 类系统有两种亚型 A 型和 B 型, 其中激烈热球菌的 A 型靶标比较不同, 它识别的是 mRNA。I 类和 III 类

CRISPR 系统的共同特点是都含有多个 Cas 蛋白, 由多个蛋白形成复合结构进行 DNA 切割(Gottesman, 2011)。而 II 类 Cas 系统仅有一个 Cas 蛋白对目标 DNA 进行切割(Zetsche, 2015a), 并且仅存在于细菌中(Garneau, 2010)。目前, 应用最广泛且最为成熟的是 II 类 CRISPR 系统中的 CRISPR/Cas9。Cas9 蛋白有 1409 个氨基酸构成, 含有两个核酸酶结构域: HNH 和 RuvC-like, 分别位于蛋白的中间和 N 端, 负责 DNA 双链的切割。其中 HNH 结构域是一个单核酸酶结构域, 而 RuvC-like 结构域则分成三个亚结构域, RuvC I 亚结构域位于 Cas9 蛋白的 N 末端, RuvC II/III 亚结构域靠近 HNH 位于蛋白的中间。Cas9 蛋白在 crRNA 的成熟和靶标 DNA 的剪切过程中发挥重要作用(Barrangou *et al.*, 2007; Garneau *et al.*, 2010; Sapranaukas *et al.*, 2011)。2015 年张锋和他的同事在 Cell 上发表文章, 称发现了一种新的 Cas 蛋白 Cpf1。Cpf1 与 Cas9 都属于 II 类 CRISPR/Cas 系统, 它们之间存在几个明显的不同点。首先, Cpf1 蛋白是通过单一的 RNA 引导对 DNA 进行切割, 不需要 tracrRNA; 第二, Cpf1 识别的 PAM 是富含 T 的区域, 而 Cas9 系统的 PAM 区则为 NGG; 第三, Cpf1 蛋白切割产生的 DNA 断裂是粘性末端, 而 Cas9 蛋白切割产生的是平末端(Zetsche, 2015b)。

3.3 CRISPR/Cas 系统作用机制

CRISPR/Cas 系统发生作用是分以下三步进行的。第一步为获得阶段, 即外源 DNA 的获得。细菌古生菌等将噬菌体携带的一小段外源 DNA 插入整合到自身基因组中, 这段插入的序列即为 spacer, 充当感染的“记忆”功能, 插入的位置则是相邻 repeat 之间, 这些 spacer 序列被 repeat 序列间隔使机体可以区分序列是内源的还是非内源的。第二步表达产生小的 CRISPR derived RNAs(crRNAs)。这些 crRNAs 通过不同的方式加工成熟。目前已知几种 Cas 蛋白作为核算内切酶对 pre-crRNA 的特定区域进行切割, 以形成成熟的 crRNAs。如: Cas6(Carte, 2008)、Csy4(Haurwitz, 2010)、Cas3(Brouns, 2008)等。第三步, 当外源同族基因组再次侵染细菌时, crRNA 与 Cas 蛋白结合形成 CRISPR 核糖核蛋白复合物, 对外源 DNA 进行沉默。在 I 类和 III 类 CRISPR 系统中 pre-crRNA 被 Cas 核酸酶切割成多种小的 RNA, III 类 crRNA 会对 3'端进一步修饰以产生成熟的 crRNA。成熟的 I 类和 III 类 CRISPR 系统中的 crRNA 与相应的蛋白酶结合形成复合体, 对靶位点

进行识别和降解。II 类 CRISPR 系统中,crRNA 与反式激活 crRNA(trans-activating crRNA, tracrRNA)结合形成复合物,与 Cas9 蛋白作用对目标位点进行切割。图 1.2 阐释了三类 CRISPR 系统进行获得性免疫的作用机制。

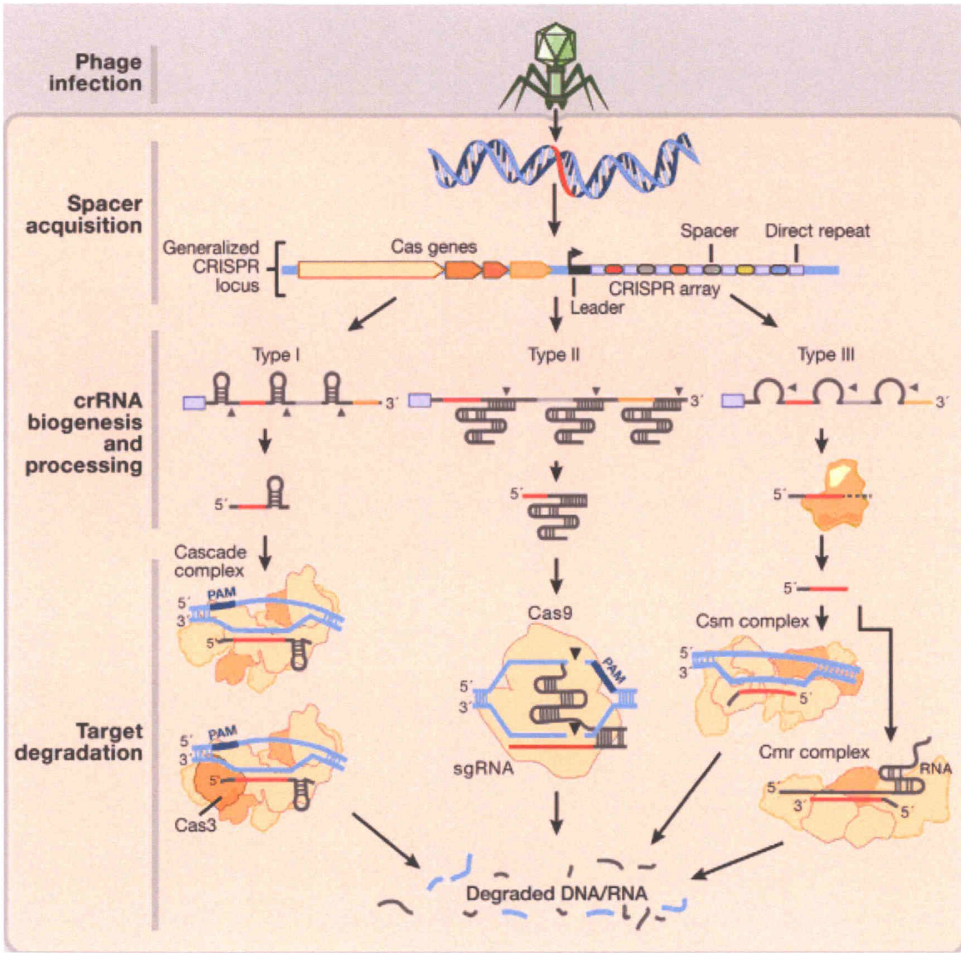


图 1.2 CRISPR 系统免疫机制

Figure1.2 Natural mechanisms of microbial CRISPR systems in adaptive immunity

注：图片来源(Hsu *et al.*, 2014)

3.4 CRISPR/Cas9 系统在果蝇基因组编辑中的应用

最先将 CRISPR/Cas9 应用做果蝇基因组编辑技术的是美国的科学家 Gratz, 他设计了两个质粒, 一个是 Hsp70 启动表达 Cas9 的质粒; 一个是 U6 poll III 启动子启动转录的 gRNA。将两个质粒同时注射到果蝇早期胚胎中, 成功得到果蝇

yellow 基因的 NHEJ 突变, 并且可以稳定的遗传给后代, 这个突变效率是比较低的, 仅有 5.9% 左右。作者同时也提出: 如果同时设计两段 gRNA, 或许可以导致基因片段的敲除; 同时注射 donor 质粒, 或许可以在基因组中引入小的外源 DNA 片段(Gratz *et al.*, 2013)。虽然突变效率不高, 但是 Gratz 成功将 CRISPR/Cas9 技术应用在果蝇上, 拉开了利用 CRISPR/Cas9 技术对果蝇进行基因组编辑的序幕。接下来, 两个实验室同时将体外转录得到的 Cas9 mRNA 和 gRNA 注射到果蝇早期胚胎中, 结果得到了非常高的突变效率(Basset *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013)。根据 Bassett 的报道, 通过这种方法可以介导果蝇 *yellow* 基因突变效率高达 88%。Yu 实验结果也显示了在 *yellow* 基因中 80% 的突变效率, 同时 Yu 还成功敲了果蝇基因组中的其他六个靶位点, 揭示了 CRISPR/Cas9 技术超过以往任何一中基因组编辑技术的高效性以及普遍应用的价值。这种注射质粒和 mRNA 的差异猜测可能是由于 Cas9 蛋白和 gRNA 表达水平以及时间差异引起的。同样是 2013 年, Kondo 做了生殖细胞表达 Cas9 的果蝇和全身普遍表达 gRNA 的转基因果蝇。当将两种果蝇杂交后, 可以得到突变后代, 并且突变效率到达 90%。同时引入两个 gRNA 则得到了 1.6kb 的大片段敲除(Kondo and Ueda, 2013)。这种方法要得到不同 gRNA 的转基因果蝇是比较耗费时间的, 同时后代要去掉 cas9 和 gRNA 也需要大量的时间, 但是这种方法相对于直接注射的好处是后代可遗传率比较高。之后, 科研工作者陆续制备了各种生殖细胞特异表达 Cas9 的转基因果蝇, 比如 *vasa* 启动子特异启动(Sebo *et al.*, 2013)或者 *nanos* 特异启动(Ren *et al.*, 2013)。这些转基因果蝇品系 Cas9 蛋白只在生殖细胞特异性表达, 因此可以避免体细胞的毒性, 能够产生较多的可育后代。不同染色体的 Cas9 转基因品系都有, 因此可以利用不同染色体的 Cas9 转基因品系获得可育后代, 之后通过杂交很容易地去掉 Cas9。2014 年 Bassett 制备的 Actin5C 启动 Cas9、U6 启动 gRNA 的载体可以在果蝇细胞系中表达, 并且得到了 80% 的突变效率。

在果蝇(Beumer *et al.*, 2013)以及 S2 细胞(Bassett *et al.*, 2014)中的尝试发现, 在要插入片段的两端添加 1kb 的同源臂可以高效地引导外源 DNA 的插入, 这种方法可以通过引入 marker 基因直接在后代检测出来, 或者可以通过 PCR 的方法很方便地检测出来。Xue 等做了 10xUAS 驱动 Cas9 表达以及 gRNA 的转基因果蝇品系, 其中 gRNA 的目标基因为六个表型已知的基因: *y*, *notch*, *bam*, *nos* 以及

ms(3)k81, 另外做了组织特异性表达的 Gal4 品系, 将 Gal4 品系与 10xUAS-Cas9 品系杂交后, 成功观察到了后代不同组织的相应突变表型(Xue *et al.*, 2014)。实现了基因的组织特异性突变。Qi 等设计了失活的 Cas9 蛋白(dCas9), 它的 RuvC 和 HNH 核酸酶结构域不发挥作用, 但是还可以与靶位点的 DNA 结合, 在空间上阻止了靶基因的转录从而抑制了靶基因的表达(Qi *et al.*, 2013), 被称为 CRISPRi 技术。另一方面, 将失活的 Cas9 蛋白联结上 DNA 转录元件 VP16、VP64 或者 p65 等, 则可以有效的提高基因的表达水平, 尤其是内源表达很低的基因(Konermann *et al.*, 2013; Maeder *et al.*, 2013; Perez *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013b)。

3.5 CRISPR/Cas9 系统的优势和局限

CRISPR/Cas9 系统是一个天然存在的原核生物 RNA 干扰系统, 其介导的基因组编辑是由 crRNA 指导的, 对靶序列的识别是 RNA 与 DNA 的碱基配对过程, 相比蛋白质对 DNA 序列的识别要精确更多, 而且 CRISPR/Cas9 的构建仅仅需要设计与靶序列互补的 RNA 即可, 每个针对特异位点的 crRNA 只有几十个碱基, 整个载体较小, 相对于 ZFN 和 TALEN 载体, 更加容易构建, 大大提高了基因操作的效率及简便性。针对不同的突变位点, Cas9 是通用的, 所以在打靶不同位点时, 只需要设计不同的 crRNA 即可, 多个针对不同位点的 crRNA 可以同时导入细胞发挥作用。

但是, CRISPR/Cas9 系统在真核基因组编辑中也存在一些不足。首先, 除了需要 crRNA 和目标序列匹配外, 目标序列(protospacer)附近必须存在一些小的前间区序列邻近基序 PAM, 目前证明 PAM 序列为 NGG(Wei *et al.*, 2013)。如果目标序列周围不存在 PAM 或者无法严格配对, 则 Cas9 蛋白不能行使核酸酶的功能或者切割效率大大降低, 这也造成了利用 CRISPR/Cas9 不能对任意序列进行切割。其次, CRISPR/Cas9 系统所需靶向的序列仅需十余个碱基对精确配对, 这可能降低 CRISPR/Cas9 系统切割的特异性, 产生脱靶效应(Fu *et al.*, 2013; Mali *et al.* 2013)。但对黑腹果蝇而言, 由于果蝇的基因组相对较小, 可以很好的挑选靶位点以避免脱靶效应。另一个问题是, 不同的 sgRNA 位点的切割效率差异很大, 这可能由多种原因造成的, 比如 sgRNA 的二级结构, sgRNA-DNA 结构的热稳定性, 目前这方面的研究还没有进行, 因此设计 gRNA 的时候多个位点是非常

有必要的。

另一方面, 由于 CRISPR/Cas9 技术令人激动的应用在基因编辑上, 由此带来的社会挑战以及灾难性应用的担心也由此而来。但是无论如何, CRISPR/Cas9 作为生物技术工具的巨大价值是无法湮灭的。

4 果蝇章鱼胺受体的研究

4.1 引言

无脊椎动物中, 章鱼胺(octopamine)是一种重要的生物胺, 结构上和脊椎动物的去甲肾上腺素类似, 在无脊椎动物的神经组织和非神经组中都可以发现章鱼胺。研究表明, 章鱼胺几乎调控着无脊椎动物所有的生理过程。在外围和中央神经系统中, 章鱼胺作为神经调质和神经递质发挥作用。外周神经系统中, 章鱼胺调控着骨骼和内脏肌肉以及其他的外周靶器官包括脂肪体、输卵管、感觉器官等 (Evans and O'Shea, 1977; Whim and Evans, 1988; Orchard and Lange, 1985; Evans, 1978; Verlinden *et al.*, 2010); 中央神经系统中, 章鱼胺作为神经调质调控着各种行为包括节律反应 (Crocker *et al.*, 2010;), 果蝇运动 (Yellman *et al.*, 1997)、蜜蜂舞蹈和叮咬行为 (Barron *et al.*, 2007; Burrell and Smith, 1995)、蝗虫感觉的输入与脱敏 (Smobati and Holy, 1984b) 以及许多复杂的社会行为包括劳动建立 (Schulz *et al.*, 2002)、学习和记忆 (Mizunami *et al.*, 2009)、果蝇条件交配 (O'Dell, 1993) 等。当章鱼胺被释放到血淋巴中时做为神经激素发挥作用时, 与昆虫的应激反应 (Fields and Woodring, 1991)、免疫反应 (Baines and Downe, 1994; Kim and Kim, 2010) 等有关。章鱼胺调控这一系列行为是通过不同类型的章鱼胺受体 (Octopamine receptors, OARs) 实现的。目前科研工作者已经从黑腹果蝇体内克隆得到多个章鱼胺受体, 2005 年 Even 等根据黑腹果蝇体内克隆得到的不同章鱼胺受体与脊椎动物肾上腺素受体在结构和信号通路方面的相似性将章鱼胺受体分为三种不同的类型: α -adrenergic-like Octopamine Receptros(OA1)、 β -adrenergic Octopamine Receptors (OA2) 以及 octopamine/tyramine 或者 tyraminerbic(TyrR)受体 (Evans and Maqueira, 2005)。其中 OA1 与脊椎动物 α -肾上腺素受体基因序列有高度的同源性, 在章鱼胺的刺激下通常引发胞内钙离子浓度增加, 同时也可以小幅度增加胞

内 cAMP^+ 水平(Han *et al.*, 1998; Grohmann *et al.*, 2003; Duportets *et al.*, 2010; Balfanz *et al.*, 2005; Ohtani *et al.*, 2006); OA2 与脊椎动物 β -肾上腺素受体高度同源, 在章鱼胺的刺激下通过改变胞内 cAMP^+ 浓度发挥作用(Maqueira *et al.*, 2005; Even *et al.*, 2005), OA2 又被细分为几个不同的类型, 它们彼此之间在药理学性质上存在差异。第三类章鱼胺受体 octopamine/tyramine 受体在结构上同样和脊椎动物 α -肾上腺素受体基因序列具有同源性, 在药理学试验中发现章鱼胺和酪胺(tyramine)均能激活该受体。当 octopamine/tyramine 受体被酪胺激活时能够抑制腺苷酸环化酶的活性, 从而降低胞内 cAMP^+ 水平(Saudou *et al.*, 1990; Vanden *et al.*, 1995; Poels *et al.*, 2001; Ohta *et al.*, 2003; Blenau *et al.*, 2000); 被章鱼激活则引起胞内钙离子的释放(Robb *et al.*, 1994; Reale *et al.*, 1997)。实际上很多研究发现这类受体更倾向于被酪胺激活, 因此有人认为它们是一种酪胺受体(Nagaya *et al.*, 2002; Roeder *et al.*, 2003)。之后, 又陆续在果蝇中克隆得到了一类新的受体可以特异性地被酪胺激活, 并且在冈比亚按蚊(*A. gambiae*)和意大利蜜蜂(*A. mellifera*)基因组信息中同样找到了这类受体基因。因此, 2012 年 Farooqui 又对 Even 的分类系统做了补充, 添加了新的 TA2 受体(Farooqui, 2012)。章鱼胺和酪胺是目前发现的仅有的两种非肽类神经活性物质, 只在无脊椎动物中发挥生理作用。截至目前, OARs 只在无脊椎动物中发现, 还没有在脊椎动物中发现, 因此 OARs 被视为潜在杀虫剂靶标。

4.2 章鱼胺受体的信号转导途径

OARs 属于 G 蛋白偶联受体(G-protein-coupled receptors GPCRs)大家族, GPCRs 是一类古老而庞大的家族, 在生物体信号转导过程中发挥着重要作用。GPCRs 有七个疏水线性 α -螺旋跨膜结构域, 通过 G 蛋白(guanine nucleotide-binding regulatory proteins)进行信号传递。七个疏水性跨膜结构域通过三个胞内环(Intracellular Loops, IL)和三个胞外环(Extracellular Loops, EL)联系在一起, 胞外的 NH₂ 末端通常是糖基化的, 而胞内的 COOH 端通常是磷酸化的。当 GPCRs 被激活后, 将信号传递到胞内的鸟嘌呤结合蛋白(G 蛋白), 鸟嘌呤结合蛋白激活或抑制特定的靶蛋白, 引起胞内第二信使浓度的改变。与其它 GPCRs 一样, 章鱼胺受体的信号转导过程也引起胞内第二信使浓度的改变。根据偶联蛋白的不

同,可使胞第二信使 cAMP^+ 、或者 Ca^{2+} 浓度改变。实际上也是根据这种不同第二信使浓度改变来区分不同受体亚型的。

第一种,是 $[\text{cAMP}]_i$ 水平上升或者下降。细胞内分反应严格依赖受体和 G 蛋白之间的特异性作用(Gudermann *et al.*, 1996, 1997)。当受体和 Gs 蛋白偶联,被激活的 $\text{G}_{\alpha\text{s}}$ 亚单位与细胞质膜上的腺苷酸环化酶(AC)相互作用,导致腺苷酸环化酶活性的升高,从而使 ATP 转化为 cAMP。接下来,由于 $[\text{cAMP}]_i$ 水平上升,激活了 cAMP 依赖型蛋白酶 A 的活性(protein kinase A, PKA)。PKA 可以将各种底物分子中如:胞浆蛋白、配体门控、电压门控的离子通道以及一些转录因子(如: CREB, CREM, ATF-1)等的丝氨酸和苏氨酸磷酸化(De Cesare *et al.*, 1999)。另外,也有一些 GPCRs 与 G_i 蛋白(inhibitory G protein)相互作用,起到抑制腺苷酸环化酶的作用。腺苷酸环化酶与 $\text{G}_{\alpha i}$ 亚单位的作用阻碍了其 $\text{G}_{\alpha\text{s}}$ 亚单位的作用,因此抑制了腺苷酸环化酶的活性。

另一条途径是通过改变 Ca^{2+} 浓度实现的。受体与 $\text{G}_{\alpha\text{q}}$ 蛋白家族相结合(Guderman *et al.*, 1996, 1997)。 $\text{G}_{\alpha\text{q}}$ 亚基与磷脂酶 C(Phospholipase C, PLC)相结合并且促进其活性(Rhee and Bae, 1997)。PLC 水解两种底物磷酸肌醇和 4,5-二磷酸,得到两种第二信使: IP_3 和 DAG。其中, IP_3 随意扩散并结合到内质网上特定的 IP_3 受体上,这些受体通常是一些 Ca^{2+} 通道。当 IP_3 与 Ca^{2+} 通道结合后, Ca^{2+} 通道打开,使得 Ca^{2+} 从内质网流入到细胞质中。 Ca^{2+} 通过直接调节酶和离子通道的活性在调节许多细胞功能中发挥至关重要的作用。另外, Ca^{2+} 也可以与许多蛋白直接结合如:钙调蛋白、钙结合蛋白、钙网膜蛋白等,这些蛋白通过相互结合控制并且调节许多蛋白效应器的活化。另一方面,由于 PLC 水解底物不仅产生 IP_3 ,同时也产生 DAG。与 IP_3 释放不同, DAG 仍与膜相关,它激活的是蛋白酶 C(Protein kinase C, PKC)。PKC 的完全活性却需要 DAG 和 IP_3 的同时存在。与 PKA 类似, PKC 同样水解蛋白质的苏氨酸和丝氨酸残基,从而改变这些蛋白质的生物活性。

总之, GPCR 活化使细胞内产生各种包括第二信使在内的级联反应。同一细胞中不同第二信使参与的反应可能同时发生,这些不同信号通路的同时作用最终导致细胞反应的扩大或减小。

4.3 果蝇章鱼胺受体的研究进展

1998 年, Han 等首次从黑腹果蝇体内克隆得到了章鱼胺受体命名为 OAMB, OAMB 在果蝇蘑菇体(mushroom body)和椭球体(ellipsoid body)中高表达, 这两个神经元的结构对学习、记忆、运动控制和酒精功能耐受有重要作用(Davis, 1996; Han *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1999; Scholz *et al.*, 2000)。当对稳定表达 OAMB 的细胞使用章鱼胺时能够促进 cAMP⁺以及胞内钙离子的积累, 表明 OAMB 可能通过不同的信号转导途径发挥不同的生理功能。随后, Han 等利用 P 元件诱导的突变获得了 OAMB 不同的突变品系, 发现 *oamb* 突变体雌虫求偶和交配表现正常, 但是很多成熟的卵停留在卵巢中而不能正常产卵。同时发现 OAMB 不仅在脑中表达, 在胸腹神经节(thoracicoabdominal ganglion, TAG)和雌虫生殖系统以及卵巢中成熟的卵中也有表达(Lee *et al.*, 2003)。接下来 Balfanz 从果蝇体内克隆出两类编码不同的 OARs 的基因: *Dmoa1* 和 *Dmoa2*, *Dmoa1* 有两个不同的剪切体 DmOA1A 和 DmOA1B, 他们在包含跨膜域在内的 N 末端相同, 但是在 C 末端存在差异。对 DmOA1A/1B 表达的细胞使用章鱼胺, 纳摩尔级浓度即可引起胞内钙离子浓度的改变, *Dmoa2* 受体激活则是通过 cAMP 途径进行的(Balfanz *et al.*, 2005)。最近的研究还发现, 位于蘑菇体 $\alpha\beta$ 和 γ 神经元的 OAMB 受体是调节果蝇取食学习行为的关键分子机制, 恢复 OAMB 突变体果蝇两个亚型的任意一个都可以恢复果蝇的取食学习行为(Kim *et al.*, 2013)。

Maqueira 等 2005 年发表文章发现了新的章鱼胺受体家族: DmOct β 1R (CG6919)、DmOct β 2R (CG6989) 以及 DmOct β 3R (CG7078)。这三类受体都跟脊椎动物的 β 肾上腺素同源, 并且在 CHO 细胞系中稳定表达后三种受体都表现为倾向于被章鱼胺激活而不是酪胺, 都引起细胞内 cAMP⁺浓度的改变(Maqueira *et al.*, 2005)。研究还发现 Oct β 2R 同样是果蝇产卵过程的分子基础, 并且招募 PKA 和 CaMKII 作为下游的效应器发挥作用。Oct β 2R 纯合突变体同样表现出不能产卵的现象, 在输卵管上皮细胞恢复 Oct β 2R 即可恢复产卵, 表明 Oct β 2R 影响产卵行为的主要作用部位是在输卵管上皮细胞(Lim *et al.*, 2014)。Ohhara 等用 RNAi 的方法在果蝇的前胸腺(Prothoracic Gland, PG)下调 Oct β 3R 基因表达导致蜕皮激素的缺乏而抑制蜕皮, Oct β 3R 基因表达下调同时影响 PTTH 和 Ilps 信号, 推测只有在幼虫发育过程中获得足够的体重和营养后才能激活下游的一元胺信号从

而允许变态的发生(Ohhar *et al.*, 2014)。

Wu 等在研究二化螟(*Chilo suppressalis*)章鱼胺受体时克隆得到了一类新的 OARs 家族, 测序结果显示该基因有两个剪切体, 并将其命名为 CsOA3L 和 CsOA3S。CsOA3S 与 CsOA3L 相比在胞内 3 环处少了 30 个氨基酸。药理学实验结果显示, CsOA3S 偶联 G_i 和 G_q 蛋白分别引起胞内 $cAMP^+$ 浓度下降和 Ca^{2+} 浓度升高, 而 CsOA3L 则只偶联 G_q 蛋白造成胞内 Ca^{2+} 浓度上升(Wu *et al.*, 2014)。二化螟 OA3 受体在果蝇中的同源基因为 *CG18208*。武亚苏克隆得到了果蝇 DmOA3L, 初步的药理学实验发现 DmOA3 在胞内偶联 G_i 蛋白引起 $cAMP$ 浓度下降(武亚苏, 2015)。截止目前, 还没有任何关于这类新型的章鱼胺受体 OA3 受体生理功能的报道。

5 展望

章鱼胺作为神经递质、神经调质、神经激素, 在昆虫的生理功能中发挥着重要作用, 使它们可以很好的适应外界环境。并且章鱼胺和酪胺是仅有的两种非肽类神经活性物质, 只在无脊椎动物中发挥生理作用, 被视为很好的潜在杀虫剂靶标。目前, 对 α -adrenergic-like Octopamine Receptros(OA1)和 β -adrenergic Octopamine Receptors (OA2)两类受体的药理学和生理功能的研究已经有一些进展, 但是对 octopamine/tyramine 受体、tyramine 受体以及新型章鱼胺受体 OA3 受体的研究还很少。通过反向分子遗传手段、DNA 芯片技术以及比对更多的昆虫基因组序列等方法能够帮助我们更好地解释章鱼胺受体的分子机制以及章鱼胺信号通路在昆虫神经系统中发挥的作用。对章鱼胺受体受体药理学和功能研究可以帮助我们寻找潜在的特异性高效激动剂和拮抗剂, 从而为新的高效杀虫剂的研制提供基础。

第二章 利用 CRISPR/Cas9 技术敲除果蝇 *white* 基因

1 引言

CRISPR/Cas9 技术以其低廉的造价和简便快速的操作过程在短短十几年的时间内得到迅速的发展。理论上, 该技术可以对所有生物的任何基因进行 DNA 序列的删除、插入、编辑, 以得到特定基因的功能和调控原件信息。多位点编辑更是可以大范围探究基因或者蛋白的作用网。同样的, 特定位点操纵转录调控或者染色体的位置可以解释细胞内的遗传物质是怎样得到组织和利用的, 同时揭示基因组结构和功能之间的联系。全世界利用 CRISPR/Cas9 技术对各种各样的生物进行基因功能的研究正在蓬勃发展。果蝇作为重要的模式生物是最早应用 CRISPR/Cas9 技术的活体生物之一。果蝇基因组大小约为 1.65×10^5 kb, 仅为人类的 1/20, 可以很方便对其进行基因组编辑。本实验室之前还没有展开果蝇基因组编辑的工作, 为了在本实验室建立果蝇 CRISPR/Cas9 体系, 我们首先选择果蝇 X 染色体上决定眼色的基因 *white* 进行定点突变。

研究表明, 果蝇眼色形成是由红色素和褐色素的合成和沉积形成的。其中, 红色素由鸟嘌呤前体而来, 而褐色素由色氨酸前体合成而来 (Summer *et al.*, 1982)。果蝇 *white* 基因属于 ATP-binding cassette(ABC)transporter 基因家族, 其编码的转运蛋白位于色素颗粒膜上, 可以将细胞质中的色素前体转运到色素颗粒里面。在黑腹果蝇中, 还有另外的两个基因负责眼色素前体的转运分别是 *scarlet* 和 *brown*。*white* 基因编码的 *white* 蛋白和 *scarlet* 基因编码的 *scarlet* 蛋白结合形成二聚体, 将阿敏色素前体从细胞质转运到色素颗粒中; 同样的 *white* 蛋白和 *brown* 基因编码的 *brown* 蛋白将蝶啶前体从细胞质转运到颗粒体 (Mackenzie *et al.*, 2000)。因此, *scarlet* 基因和 *brown* 基因突变果蝇分别缺少阿敏眼色素和蝶啶, 而 *white* 基因突变则导致两种眼色素的缺乏, 造成果蝇白眼突变表型 (Ewart and Howells, 1998)。我们首先选择果蝇 *white* 基因进行定点突变, 如此只要要在 G1 代观察果蝇眼睛颜色即可得知 CRISPR/Cas9 系统是否突变成功。

2 材料与方法

2.1 供试昆虫

本实验所用野生型的黑腹果蝇 *D. melanogaster* 来自本实验室世代培养。果蝇饲养于人工培养箱(温度控制在 25℃，湿度在 70%，光周期为 L:D=12h:12h)内。所用饲料为标准的玉米粉培养基，其组分为 6.68%的玉米粉、9.18%的黄豆粉、0.6%的琼脂、2.5%的酵母粉、4%的蔗糖、4.24%的麦芽糖、0.25%的尼泊金甲酯和 0.1%的苯甲酸钠。本试验所用试剂均购自 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)。每周一次将羽化的成虫换至装有饲料的新试管中。

果蝇饲料配方如下：

成分	重量
水	1 L
玉米粉	66.83 g
大豆粉	9.18 g
琼脂粉	6 g
酵 母	25 g
蔗 糖	40 g
麦芽糖	42.4 g
尼泊金甲酯	2.5 g
苯甲酸钠	1 g

2.2 主要质粒和菌株

菌株和质粒	来源
psp6-2SNLS-spCas9	张博实验室
pMD19-T gRAN scaffold vector	北京大学熊敬伟博士实验室
pDCC6	Addgene
pCDF5	Addgene
Trans-T1	北京全式金生物公司

2.3 主要试剂和仪器

用于试验的主要试剂有：限制性内切酶(NEB, UAS; Thermo, UAS); 高保真酶(Q5 high-Fidelity DNA Ppolymerase, NEB, UAS; Kod FX, TOYOBO, Japan); T4 DNA 连接酶(T4 DNA Ligase, Thermo, UAS); 牛小肠碱性磷酸化酶(Alkaline Phosphatase Calf Instestinal, CIP, NEB, UAS); 感受态细胞(Trans-T1, 全式金, China); 醋酸铵; 高乐士漂白水(购自淘宝); 透明双面胶(Double slided tape, Scotch, UAS)苹果汁; 蛋白酶 K(Proteinase K, SIGAMA, UAS); One step cloning Kit(Vazyme, China); Gibson assembly Master Mix(New England BioLabs, UAS)。

用于试验的主要试剂盒有：凝胶回收试剂盒 (Axygen Gel Extration Kit, Axxygen, UAS); 质粒抽提试剂盒(QIAGEN Plasmid Midi Kit, QIAGEN, Germany); sp6 体外转录试剂盒(Sp6 Mmessage Mmachine Kit, Ambion, UAS); E.coli Poly[A] Polymerase Kit(New England BioLabs, UAS); MEGAclean Kit(Ambion, UAS); RiboMAX Large Scale RNA Production Systems-T7 Kit(Promega, UAS)。

用于试验的主要试验仪器：NanoDrop 2000 微量分光光度级(Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE)、ABI PRISM 7500 real-time 仪器(Applide Biosystems, UAS)、P97 拉针仪(SUTTER, UAS)、FemtoJet 4i 微量注射仪(eppendorf, Germany)、PCR 扩增仪(veriti 96 well Thermal Cycler, ABI, UAS)、凝胶成像仪(Gel DOC XR Molecular Imager, BIO-RAD, UAS)等。

2.4 CRISPR/Cas9 靶位点的选择

通过 flybase(<http://flybase.org/>)数据库查找所选基因的 CDS 序列和基因组序列，通过 NCBI 网站在线的 Nucleotide Blast 程序比对各基因 CDS 序列和基因组序列，分析出内含子与外显子部分。使用 flycrispr 网站的 Flycrispr Optimal Target Find(<http://flycrispr.molbio.wisc.edu/tools>)在线查找备选 gRNA，按照以下靶位点选择方法进行靶位点的选择：

- (1) 主要遵循 5'-N19-21-NGG-3'的原则，N 为任意碱基，3'的 NGG 为 PAM 序列不包括在 gRNA 引物设计中。

- (2) 靶位点尽量在基因 CDS 的前 2/3 区域, ATG 之后, 不在最后一个 exon 上, 最好能破坏重要的 domain 和所有的 isoform; 也可以选择在 intron 和 exon 的交界处, 破坏基因的剪接, 原则上不要选择 5'UTR 和 3'UTR。
- (3) 本实验所用 gRNA 是 III 类 RNA 聚合酶启动子 U6:3 启动转录, 5'端含 G 以便有效启动转录。如果没有合适的 5'端 G, 只要遵循(1)即可。
- (4) 选择好的靶位点在 Flybase 上在线比对, 以确保序列的单一性。

2.5 Cas9 mRNA 的制备

2.5.1 线性化载体 psp6-2SNLS-spCas9 质粒

用 Xba I 处理载体质粒, 具体程序如下:

Xba I	8μL
载体质粒	8μg
10 X 反应缓冲液	16μL
Water	至 80μL

37°C 处理 2h; 65°C 失活 20min。

2.5.2 电泳检测线性化载体并切胶回收纯化线性化载体

酶切产物通过 1.0%的琼脂糖凝胶电泳分开得到, 用 Axygen Gel Extration Kit 凝胶回收试剂盒进行纯化回收, 具体操作步骤如下:

2.5.3 转录得到 Cas9 mRNA

使用 Ambion 公司的 mMessage mMachine sp6 ultra kit 试剂盒, 以线性化的 psp6-2SNLS-spCas9 质粒为模板, 转录得到 Cas9 mRNA,具体操作步骤如下:

- (1) 解冻试剂, 完全解冻后将 ribonucleotides(2 X NTP/CAP)置于室温, 其他试剂放置在冰上。
- (2) 按下表配制反应体系, 配制时先加水跟 ribonucleotides, 之后再加 10 X 反应缓冲液。

(3)

ddH ₂ O	至 20 μ L
2X NTP/CAP	20 μ L
10X 反应缓冲液	2 μ L
线性化质粒	0.1-1 μ g
酶	2 μ L

(4) 37°C 孵育 1h, 也可以适当延伸孵育时间以提高产率。

(5) 在反应体系中加入 1 μ L TURBO DNA 酶, 37°C 反应 15 min, 来去除 DNA 模板。

2.5.4 加 polyA 尾

使用 Ambion 公司的 Poly(A)Tailing Kit, 给转录好的 Cas9 mRNA 加 polyA 尾巴, 得到成熟的 Cas9 mRNA, 具体操作如下:

(1) 按以下方式配制反应体系:

mMESSAGE Mmachine 体系	20 μ L
ddH ₂ O	36 μ L
5X E-PAP 反应缓冲液	20 μ L
mM MnCl ₂	10 μ L
mM ATP	10 μ L

(2) 加入 E-PAP 之前, 移出 0.5 μ L 反应体系。

(3) 上述体系中加入 4 μ L E-PAP 酶, 最终反应体系为 100 μ L;

(4) 37°C 孵育 1 h。

2.5.5 Cas9 mRNA 纯化

使用 Ambion 公司的 Megaclear 试剂盒对加 polyA 的 Cas9mRNA 进行纯化:

(1) 用 Elution solution 将样品补充至 100 μ L, 充分混匀。

(2) 在样品中加入 250 μ L Binding Solution, 并用移液枪吸打混匀。

(3) 加入 250 μ L 100%的乙醇, 用移液枪吸打混匀。

- (5) 将样品加入到滤芯上，滤芯置于收集管中，10000-15000 x RCF 离心 15-60 s 至样品离心完全，弃滤液。
- (4) 在滤芯上加入 500 μ L wash buffer，10000-15000 x RCF 离心 10-30 s，弃滤液。
- (5) 重复步骤(5)。
- (6) 将滤芯放置在新的收集管中，加 50 μ L Elution buffer(提前加热至 95°C)，室温放置 1 min；10000-15000 x RCF 离心 1 min，来洗脱 RNA。
- (6) 重复步骤(7)

2.5.6 醋酸铵沉淀 RNA

- (1) 在 RNA 样品中按 1:10 的比例加入 5 M 的醋酸铵溶液；
- (2) 加入 2.5 倍体积的 100%乙醇，混匀-20°C 放置 30 min 以上；
- (3) 4°C 最大转速离心 15 min，小心移走上清；
- (4) 用 500 μ L 70%的冰乙醇清洗沉淀，再次离心，小心移走上清。
- (5) 风干离心管，加入适量 RNas-free 水。

2.6 gRNA 的制备

2.6.1 PCR 获得 gRNA 转录模板

以 pMD19-T gRNA scaffold vector 质粒(北京大学熊敬为博士提供)为模板，使用 NEB 公司的 KOD FX 高保真为模板扩增得到 gRNA 转录模板：

2X PCR 反应缓冲液	25 μ L
2 mM dNTP	10 μ L
10 pmol/ μ L primer F	1.5 μ L
10 pmol/ μ L primer R	1.5 μ L
模板	50 ng
KOD 酶	1 μ L
ddH ₂ O	至 50 μ L

2.6.2 电泳检测条带的单一性

PCR 产物通过 1%的琼脂糖凝胶电泳，检测条带是否单一。

2.6.3 乙醇沉淀 DNA

- (1) 在样品中加入十分之一体积乙酸钠(3 mol/L, pH=5.2), 使终浓度为 0.3 mol/L;
- (2) 加入二倍体积用冰预冷的乙醇，充分混匀，-20℃ 放置 30 min 以上;
- (3) 12000 x g 离心 10 min，小心移走上清，吸去管壁上所有液滴;
- (4) 加入二分之一离心管容量的 70%的乙醇，12000 x g 离心 2 min，移走上清并吸走管壁上所有液滴;
- (5) 室温下讲离心管开盖放置在桌上至液体挥发干净。
- (6) 加入适量的 RNase-free 水溶解 DNA.

2.6.3 转录得到 gRNA

使用 RiboMAX Large scale RNA Production systems-T7 试剂盒(Promega)对 gRNA 进行体外转录。

提前将四种 100mM rNTP 等体积混匀，使每种 NTP 浓度变成 25Mm，如下方式配制反应体系：

T7 Transcription 5X Buffer	20 μL
rNTPs(25mMATP,CTP,GTP,UTP)	30 μL
线性化 DNA 模板	5-10 μg
酶	10 μL
ddH ₂ O	至 100 μL

37℃ 孵育 2-4 h，也可反应过夜。

2.6.4 纯化 gRNA

在 gRNA 中加入十分之一体积的乙酸钠，后加入 2 倍体积用冰预冷的乙酸钠产生大量白色沉淀即为 gRNA，沉淀后用 RNase-free 水溶解沉淀即可。

2.7 pDCC6-W1, pDCC6-W2 载体制备

pDCC6 原始质粒为 addgene(<http://www.addgene.org/>)提供, 该质粒同时有 hsp70 启动的 Cas9 和 U63:3 启动子, 可以直接在 U63:3 启动子后面添加不同的 gRNA 序列, 单一注射加入适当 gRNA 的 pDCC6 质粒到果蝇早期胚胎内即可实现果蝇或其他生物的基因组编辑。

2.7.1 引物退火自连

引物订购需要做脱磷酸化处理, 用 ddH₂O 稀释至 100 μM, 反应体系如下:

oligo1	1 μL
Oligo2	1 μL
10X T4 DAN 连接缓冲液	1 μL
ddH ₂ O	7 μL

反应程序: 95℃ 5 min; ramp 至 25℃(-0.1℃、sec)

表 2.1 扩增 W1、W2gRNA 所用引物

Table 2.1 Primers for cloning W1、W2 gRNA

引物名称	引物序列(5'-3')
Primer name	Primer sequence(5'-3')
DM-white-g1-F	CTTCGCTGCATTAACCAGGGCTTC
DM-white-g1-R	AAACGAAGCCCTGGTTAATGCAGC
DM-white-g2-F	CTTCGCTCCGGCCACCCAGTCCGC
DM-white-g2-R	AAACGCGGACTGGGTGGCCGGAGC

2.7.2 载体酶切

Bbs I(Thermo)处理 8 μg pDCC6 质粒, 反应程序如下:

Bbs I	8 μL
pDCC6 质粒	8 μg
10 X 反应缓冲液	16 μL
ddH ₂ O	至 80 μL

37℃ 孵育 60 min。

2.7.3 载体末端脱磷酸处理

使用 NEB 公司生产的牛小肠碱性磷酸化酶(Alkaline Phosphatase Calf intestinal, CIP)对酶切载体进行末端脱磷酸处理，直接在酶切体系中加入 1 μL CIP，37℃ 孵育 30 min。

2.7.4 酶切载体纯化

酶切并且脱磷酸化处理的的载体产物通过 1.0%的琼脂糖凝胶电泳分开得到，并用 Axygen Gel Extration Kit 凝胶回收试剂盒进行纯化回收，具体操作步骤同上 2.5.2。

2.7.5 gRNA 片段与酶切载体连接

将纯化的酶切载体与退火引物进行连接，反应体系如下：

Bbs I 酶切载体	X μL(50 ng)
退火 oligo	1 μL
10 X T4 连接缓冲液	1 μL
T4 DNA 连接酶	1 μL
ddH ₂ O	至 10 μL

25℃ 孵育 1 h，之后转化至 Trans-T1 感受态细胞中。

2.7.6 连接产物的转化

将连接后的产物进行转化，具体操作方法如下：

- (1) 在刚解冻的 50 μL 全式金公司生产的 TransT1 感受态细胞中加入 5 μL 连接的产物，轻轻混匀，冰上静置 20 min；
- (2) 42°C 热激 45 sec 后，立即置于冰上 2 min；
- (3) 每管加入 800 μL LB 液体培养基，37°C，200 rpm 振荡孵育 1 h；
- (4) 在含 Amp (100 $\mu\text{g/mL}$)抗性的 LB 固体培养基平板上加入 40 μL 20 mg/mL X-gal 和 8 μL 100 mg/mL IPTG 溶液，用涂布器将其轻轻涂匀；
- (5) 取 200 μL 培养的菌液于上述平板，用涂布器将菌液轻轻涂匀；
- (6) 平板正放于 37°C 至菌液完全吸收，倒置平板继续培养 10-16 h。

2.7.7 转化子的鉴定和测序

- (1) 用灭菌的 10 μL 枪头在 LB 平板上挑取 5 个白色单菌落，分别接种于 1 mL 含 Amp (100 $\mu\text{g/mL}$)抗性的 LB 液体培养基中，37°C，200 rpm 振荡培养；
- (2) 将菌液直接送至铂尚生物技术有限公司进行测序。

表 2.2 pDCC6 gRNA 测序引物

Table 2.2 Primers for W1、W2 vector sequencing	
引物名称	引物序列(5'-3')
Primer name	Primer sequence(5'-3')
gRNA-cexu-F	CGTTATGTATACTTTTTTTGGTC
gRNA-cexu-R	TTAGTGCAGAGAGGGAGAGACCC

2.7.8 质粒 DNA 的抽提

质粒 DNA 的抽提采用 QIAGEN Plasmid Mini Kit，具体操作方法如下：

- (1) 取 1-5 mL 在 LB 培养基中培养过夜的菌液，4°C 6000 x g 离心 15 min 沉淀菌种，弃尽上清；
- (2) 加入 300 μL Buffer P1 重新悬浮沉淀，漩涡振荡使其悬浮均匀；
- (3) 加入 300 μL Buffer P2,剧烈涡旋 4-6 次，充分混匀，之后室温孵育 5 min。
- (4) 向上述混合液中加入 300 μL Buffer P3，剧烈涡旋 4-6 次使液体充分混匀，之后在冰上孵育 5 min；
- (5) 14000-18000 x g，4°C 离心 10 min，如果没有沉淀完全重新离心一次。

- (6) 在 QIAGEN-tip 中加入 1 mL Buffer QBT 以平衡, 知道 Buffer QBT 靠重力流净。
- (7) 将第五步得到的上清加入到 QIAGEN-tip 中, 使其靠重力穿过树脂。
- (8) 用 2 mL Buffer QC 洗两次 QIAGEN-tip, 使其靠重力穿过 QIAGEN-tip。
- (9) 将 0.8 mL Buffer QF 加到 QIAGEN-tip 中, 是 DNA 洗脱到 1.5 mL 管中, 如果质粒大于 45 kb, 提前将洗脱液加热到 65°C, 可以提高洗脱效率。
- (10) 在洗脱的 DNA 中加入 0.56 mL 室温异丙醇混匀, 来沉淀 DNA; 大于 15000 x g 4°C 离心 30 min; 小心移走上清。
- (11) 用 1 mL 70% 的乙醇清洗 DNA 管, 大于 15000 x g 离心 10 min, 小心移走上清。
- (12) 风干 DNA 管 5-10 min, 然后用合适的 Buffer 重新溶解 DNA。

2.8 注射样品的配制

配制最终注射样品时, Cas9 mRNA 为 300 ng/μL, gRNA 为 40 ng/μL。注射质粒时, 质粒浓度为 400 ng/μL。

如果最终样品量不超过 50 μL, 则加 ddH₂O 补至 50 μL。

- (1) 加入 1/10 体积的 3 M 醋酸钠(pH=5.2);
- (2) 加入三倍体积的 100% 的乙醇混匀;
- (3) 将样品之于 -20°C 或者 -80°C 至少 30 min;
- (4) 4°C 以最大转速离心 45 min, 小心移除上清;
- (13) 加入 100 μL 70% 的乙醇冲洗离心管, 4°C 以最大转速离心 3 min, 之后小心移除上清;
- (5) 重复步骤(5);
- (6) 用小枪头小心移走剩余液体;
- (7) 风干离心管, 加入适量的水。
- (8) 立即进行注射或 -80°C 储藏。

2.9 果蝇胚胎的显微注射

- (1) 准备产卵盘：称取 8.4 g 琼脂粉，加入 240 mL 水中，于微波炉内加热至溶解；称取 7.8 g 蔗糖溶于 75 mL 苹果汁中后与琼脂溶液混合，倒入培养皿中冷却。
- (2) 果蝇预产卵：注射前一天，收集 2-3 天的果蝇，放置在胚胎收集器中，给予避光环境，使其在涂有酵母的产卵盘子中产卵。以调整果蝇节律，使果蝇适应白天产卵。
- (3) 注射样品准备：将质粒浓度配制成 400 ng/ μ L。
- (4) 胚胎收集：将足够量的果蝇放置在胚胎收集器中，给予避光环境，使其在产卵盘表面产卵，每个半小时换一次产卵盘。将产卵盘表面的卵用自来水洗下，并用毛笔收集到 3 M 公司生产的 BD Falcon 70 μ m 细胞漏网中。用自来水冲洗掉酵母等杂质。
- (5) 胚胎脱壳：将卵至于 50%漂水中放置 2 min，之后用自来水冲洗 1 min，用 ddH₂O 冲洗 30 sec。
- (6) 排卵：在载玻片表面附一层 Scotch 透明双面胶，将卵扫到双面胶下方，吸干水，用毛笔将卵依次排在双面胶上，胚胎后端朝向一方。排卵时间 15 min，之后在卵表面涂一层混合油(halicabon oil 700: halicabon oil 200 =1:1)(Sigma, UAS)。
- (7) 注射针准备：用 P97 拉针仪(Sutter, USA)将毛细玻璃管拉成所需粗细，拉好的针放在干净的培养皿中待用。
- (8) 调整注射仪：将拉好的玻璃针装在注射仪的夹头上，调整玻璃针的角度与载物台约 30 度。移动玻璃使其轻轻撞上盖玻片，使玻璃针撞出斜面，并装上样品。
- (9) 注射：将排好的卵放在载物台上，移动载物台，对卵依次进行注射，注射在 18°C 下进行。
- (10) 注射后的培养：将注射后的卵连同载玻片放在铺有湿润滤纸的培养皿中，周围加湿润的脱脂棉防止胚胎脱水死亡，置于 18°C 培养箱中培养，18h 后将幼虫跳出放于果蝇培养管内，置于 25°C 培养。

2.10 突变检测

2.10.1 G0 代果蝇杂交策略

将注射后的 G0 代果蝇直接自交，检测后代有无白眼突变。

2.10.2 G1 代果蝇突变检测

(1) 单头果蝇 DNA 提取

1)Squash buffer 配制

ddH ₂ O	9.8μL
1M Tris(pH8.0)	100 μL
5 M NaCl	50 μL
0.5 M EDTA	20 μL

使用之前在 50 μL squash buffer 中加入 1 μL 10 mg/ml 蛋白酶 K;

- 2)将单头果蝇放入 200 μL PCR 管中，置于-20℃，冻死;
- 3)加入 50 μL 含有蛋白酶 K 的 squash buffer;
- 4)用枪头挤压果蝇使其破碎，并反复吸打 squash buffer;
- 5)将 PCR 管放在 PCR 以上进行如下程序:37℃ 孵育 30 min;95℃,2 min;
- 6)取出离心管，14000 rpm 离心 7 min;
- 7)将上清转移到新的离心管中-20℃ 放置备用。

(2) 以果蝇基因组 DNA 为模板,使用 NEB 公司的 Q5 High-Fidelity Polymerase 对靶位点附近的 750 bp 左右片段进行特异性扩增:

5x Q5 reacton buffer	10 μL
2 mM dNTPs	5 μL
10 mM primer F	2.5 μL
10 mM primer R	2.5 μL
DNA	XμL(1 ng-1 μg)
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0.5 μL
ddH ₂ O	至 50 μL

反应程序如下：98℃ 30 s；98℃ 10 s，55℃ 30 s，72℃ 20 s 35 个循环；72℃ 2 min；4℃ forever。

表 2.3 突变区域 DNA 片段克隆引物

Table 2.3 Primers for cloning mutant region

引物名称	引物序列(5'-3')
Primer name	Primer sequence(5'-3')
DM-white-JC-F	CACTTTCAAGGCCATCCACCAAG
DM-white-JC-R	GCCAAAAGTTCGCCCCGGATAGGC

(3) 将 PCR 产物进行 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测条带是否单一，将 500 bp 位点单一条带的 PCR 产物送铂尚生物技术有限公司进行测序验证，测序引物即为 PCR 引物。

3 结果与分析

3.1 *white* 基因序列分析和靶位点选择

通过 flybase 网站查找到已经公布的果蝇 *white* 基因 CDS 序列，果蝇 *white* 基因位于 X 染色体上，CDS 全长 2064 bp，包括 6 个 exon，在第二个 exon 上选择两个以 G 开头的靶位点，两个切点之间相距 43bp(图 2.1)：

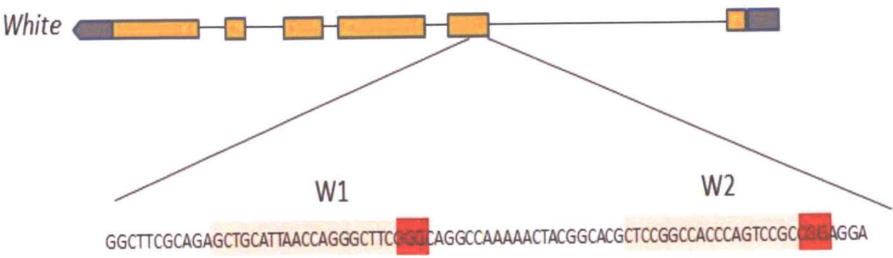


图 2.1 *white* 基因外显子分析和靶位点选择

Fig 2.1 Exon and target site of *white* gene

注：红色区域为 PAM 区，前面 20 bp 为靶位点。

3.2 Cas9 mRNA 和 gRNA 的制备

首先将 psp6-2SNLS-spCas9 载体线性化，电泳结果显示线性化后的载体条带单一且比没有线性化的载体条带位置靠上，说明线性化完全(图 2.2A)。以线性化的 psp6-2SNLS-spCas9 载体为模板转录 Cas9 mRNA，之后加 polyA 尾。电泳结果显示加 polyA 之后比转录后质量大且在 4000 bp 左右，说明转录并且加 polyA 成功(图 2.2B)。制备 gRNA 电泳结果显示在 100 bp 附近清晰条带(图 2.3)。

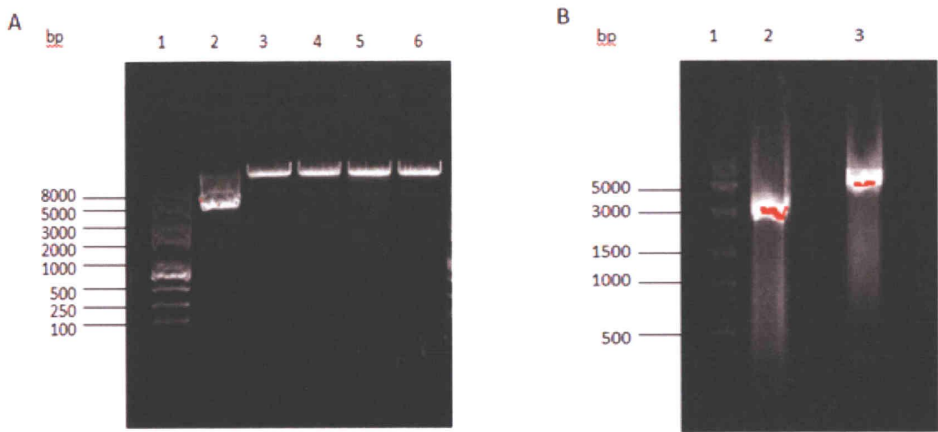


图 2.2 Cas9 mRNA 制备电泳图

Fig2.2 Electrophoretogram of Cas9 mRNA preparation (A) Linearization of psp6-2SNLS-spCas9 plasmid Lane1: Trans 2K plus II DNA Maker; Lane2: Undigested plasmid; Lane3-6 digested plasmid. (B) Electrophoretogram of Cas9 mRNA. Lane1: Trans 15K DNA Maker; Lane2: Cas9 mRNA; Lane3: Tailed Cas9 mRNA.

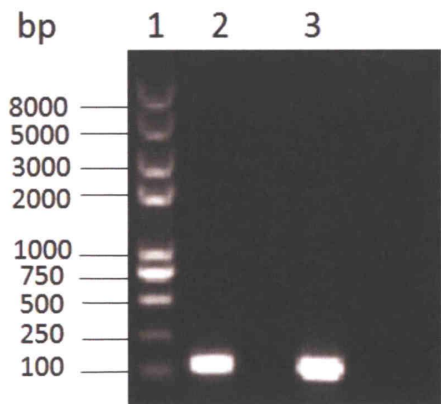


图 2.3 gRNA 电泳图

Fig2.3 Electrophoretogram of gRNA. Lane1: Trans 2K plus II DNA Maker; Lane2: W1 gRNA; Lane3: W2 gRNA.

3.3 pDCC6-W1;pDCC6-W2 载体制备

制备了 pDCC6-W1 和 pDCC6-W2 两个质粒(图 2.4)。质粒同时有 hsp70 启动 Cas9 和 U6:3 启动 gRNA 转录。可直接注射单一质粒到果蝇早起胚胎实现基因打靶。

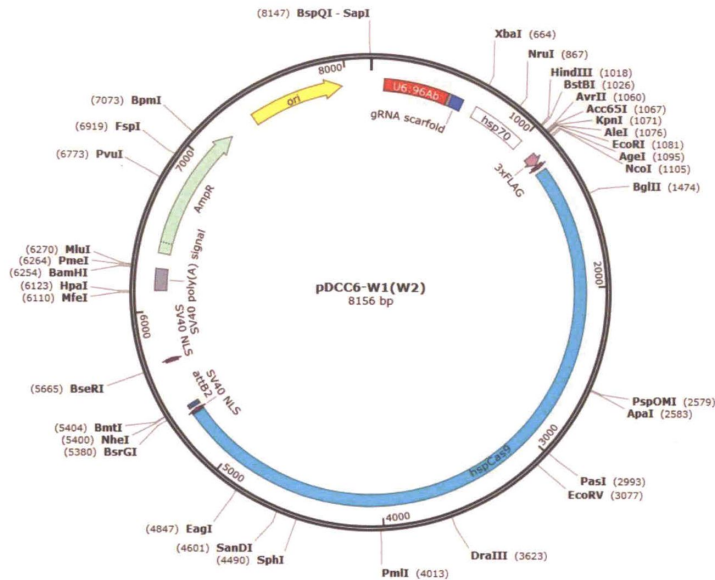


图 2.4 pDCC6-W1/W2 质粒图谱
Fig 2.4 The physical map of pDCC6-W1/W2 plasmid

3.4 G1 代突变检测

注射浓度均 400 ng/ μ L 的 pDCC6-W1 和 pDCC6-W2 的混合质粒到白眼野生型果蝇 Canton-s 早期胚胎中, 共注射 949 只 G0 代卵, 孵出幼虫 185 只, 自交后得到 10 只白眼突变果蝇(图 2.5)。单头果蝇提取基因组 DNA 之后, PCR 得到突变区域片段, 测序结果显示成功在相应位点产生突变。测序结果显示得到两种类型的突变体, 一种是至在 W1 位点产生突变, 一种是在 W1、W2 两处均产生切割, 造成两切点之间序列缺失(图 2.7), 测序峰图显示了相同的结果(图 2.8)。

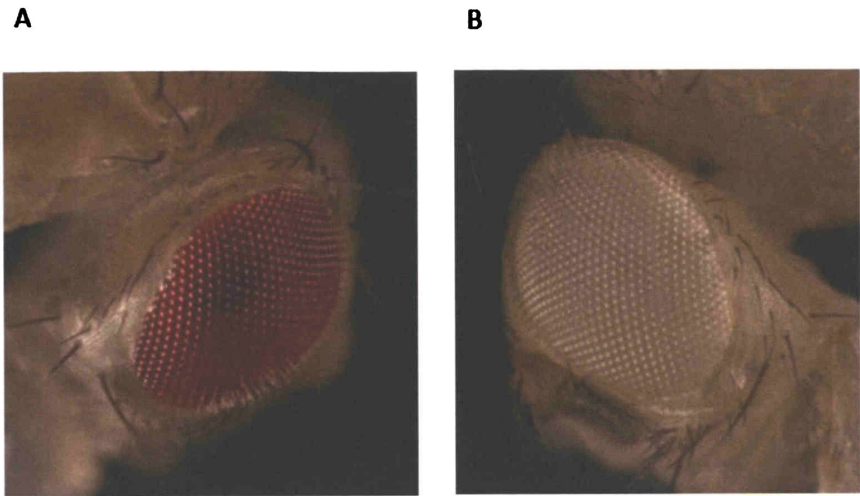


图 2.5 利用 CRISPR/Cas9 对 *white* 基因打靶

Fig2.5 CRISPR/Cas9 induce deletion at *white* loci. (A) Eye color of wild type. (B) Eye color of *white* mutant

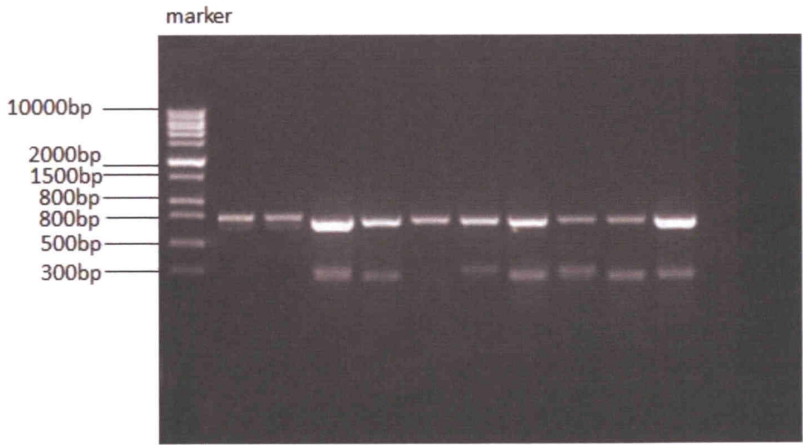


图 2.6 G1 代突变区域 PCR 电泳图

Fig2.6 PCR of G1 generation mutant region

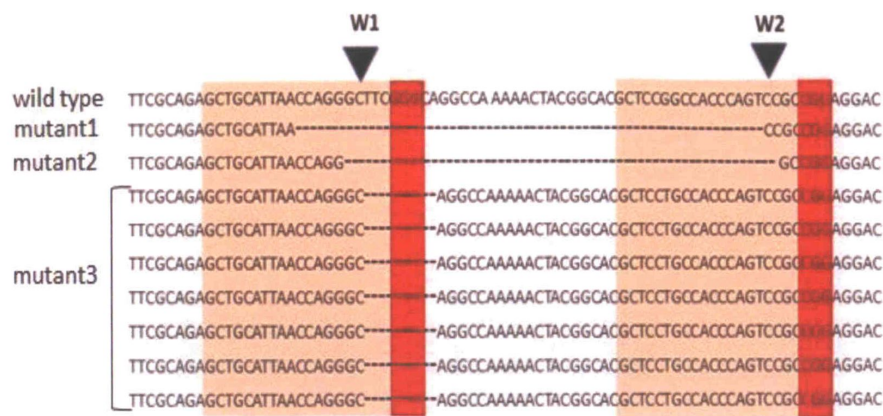


图 2.7 突变区域测序结果

Fig2.7 sequencing of target region

注：黑色箭头为切割位点，红色区域为 PAM 区，橘色区域为 gRNA 序列。

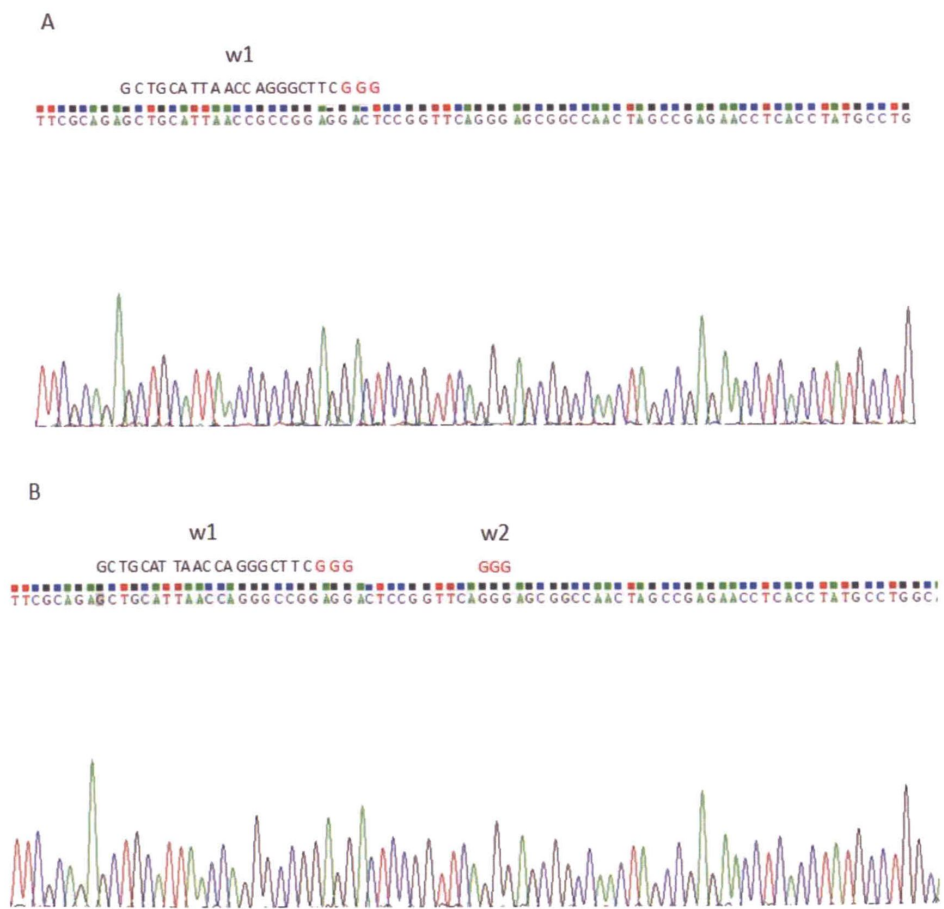




图 2.8 不同类型 mutant 测序峰图

Fig2.8 Sequencing of different type mutant. (A) Sequencing of mutant1. (B) sequencing of mutant2; (C) sequencing of mutant3;

4 讨论

本研究中, 我们通过分析果蝇 X 染色体上 *white* 基因的 CDS 序列, 得知其 CDS 序列全长 2064 bp 含有 6 个外显子, 在第二个外显子上设计了两个 gRNA 靶位点分别是 W1 和 W2, 并且两个靶位点预测切点之间的距离是 43 bp。

通过体外转录得到了 Cas9 mRNA 和 W1、W2 两位点的 gRNA, 同时将 gRNA 和 Cas9 mRNA 注射到果蝇体内, 并未观察到 G1 代白眼突变果蝇, 分析可能是操作过程中 mRNA 降解所致。

后将 W1、W2 两个 gRNA 克隆到 pDCC6 载体里面，使 pDCC6 质粒同时含有 hsp70 启动转录的 Cas9 基因和 U6:3 启动转录的 gRNA。将单一质粒注射的果蝇早期胚胎中，成功在 G1 代观察到了白眼突变果蝇。突变区域的 DNA 测序结果表明，确实在相应的靶位点产生突变。其中有 8 个 G1 代果蝇在 W1 位点产生突变。另外两个 G1 代果蝇在 W1 和 W2 两个位点都产生突变，造成两位点之间序列的缺失。

第三章 利用 tRNA-gRNA 技术实现多位点打靶 *CG18208* 基因

1 引言

随着 CRISPR/Cas9 技术的发展, Cas9 蛋白只需要跟人工制造的 gRNA 结合就可以对基因组上特定的 5'-N20-NGG-3'位点进行切割, 其中 N20 与 gRNA 序列相同为识别位点。NGG 为 PAM 区(Jinek *et al.*, 2012; Cong *et al.*, 2013; Mali P *et al.*, 2013)。gRNA 设计的简单性和基因组中普遍存在的 PAM 序列使得 Cas9-gRNA 系统几乎可以对所有的遗传元件进行编辑。对于多位点编辑, 原则上只需要将 Cas9 和多位点 gRNA 同时注射到生物体内即可。传统的方法将表达多个 gRNA 的质粒或者体外转录的多个 gRNA 直接注射到果蝇早起胚胎中(Wang *et al.*, 2013a; Jinek *et al.* 2013; Li JF *et al.*, 2013; Zhou, 2014; Shan *et al.* 2013)。Kabin 等首次利用生物体内在的 RNA 修饰过程, 从一个 RNA 转录本得到多个 gRNA。他们合成了 tRNA-gRNA 结构, 通过内源的 RNA 酶对转录本进行精确切割, 同时得到了多个 gRNA。在水稻中应用这种 gRNA 表达策略不仅实现了多位点的基因编辑, 更大大提高了基因编辑效率(Xie *et al.*, 2015)。接下来 Port 等在果蝇上应用 tRNA-gRNA 系统证明在果蝇同样可以同时高效表达多个 gRNA, 并且制备了 pCDF5 载体(Port and Bullock, 2016)。

RNA 是细胞的基本成分, 在不同的生物中 RNA 都需要保守并且精确的修饰才能成熟。tRNA-gRNA 结构可以精确切割产生多个 gRNA 与 tRNA 自身的特点是分不开的。(1)首先真核生物中 tRNA 的前体(pre-tRNAs)需要在 RNA 酶 P 和 RNA 酶 Z 的作用下对特定位点进行精确切割以去除 5'和 3'端多余序列(Phizicky and Hopper, 2010; Schiffer *et al.*, 2002; Gutmann *et al.*, 2012)。(2)RNA 酶 P 和 RNA 酶 Z 只需要识别 tRNA 结构, 不需要识别 pre-tRNA 序列(Barbezier N *et al.*, 2009; Canino *et al.*, 2009)。之前的研究表明只有转运 RNA 的接受茎 D 环和 T ψ C 环才是 pre-tRNAs 切割必需的(Kruszka K *et al.*, 2003)。(3)tRNA 是细胞质中含量很多的物质, 因此细胞质中必定同时可以对大量的底物进行剪切修饰。(4)tRNA 包含内部启动子原件, 可以招募 RNA 聚合酶 III (Pol III)复合体(White *et al.*, 2011; Dieci *et al.*, 2007), 因此, tRNA 可以作为 Pol III 的转录增强因子。

章鱼胺是一种重要的生物胺，被不同的神经元释放，并通过不同类型的章鱼胺受体影响胞内第二信使浓度变化来发挥作用。研究表明，章鱼胺在昆虫几乎所有的生理过程中都发挥重要作用。章鱼胺受体分三种不同的类型，与脊椎动物 α -肾上腺素受体受体同源的 α -adrenergic-like Octopamine Receptros(OA1)、与 β -肾上腺素受体同源的 β -adrenergic Octopamine Receptors (OA2)以及同样与 α -肾上腺素受体同源的 octopamine/tyramine 受体。目前对章鱼受体药理学和行为的研究多局限在 OA1 受体和 OA2 受体，octopamine/tyramine 受体药理学性质和生理功能还不是很清楚。Wu 从二化螟(*Chilo suppressalis*)体内克隆得到新型章鱼胺受体，并且发现 CsOA3 受体基因没有内含子，有两个剪切体，命名为 CsOA3S 和 CsOA3L。CsOAL 与 CsOA3S 相比，在胞内 3 区处多了 30 个氨基酸。二化螟 CsOA3 受体在果蝇体内同源的基因为 *CG18208*。武亚苏从果蝇体内克隆得到了 DmOA3L 受体，初步的药理学实验发现 DmOA3 在胞内偶联 Gi 蛋白引起 cAMP⁺ 浓度下降（武亚苏，2015）。果蝇中这类新型的章鱼胺受体 OA3 发挥的生理作用还不清楚。

本研究通过 tRNA-gRNA 技术对果蝇 *CG18208* 基因实现多位点打靶，为研究果蝇新型章鱼胺受体 DmOA3 生理功能提供基础。

2 材料与方法

2.1 供试昆虫

Cas9 背景黑腹果蝇 51323，饲养方法同第二章 2.1。本实验所用试剂均购自 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)。

2.2 *CG18208* 基因靶位点选

为了使 Gal4 的表达模式跟 *CG18208* 相同，在第一外显子上选择靶位点，且第一个靶位点尽量靠近起始密码子 ATG，靶位点选择方法同第二章 2.4，选择结果如下：

OA3-1	GATGTTGCCCGTATTGATGT	TGG
OA3-2	GCATACCGCCGCTCCTCGGC	TGG

OA3-3CTGGGATGGCCGGTATCCCA TGG

OA3-4GTGTGACATCCACTCCGCGA TGG

2.3 Donor 质粒制备

2.3.1 果蝇基因组 DNA 提取

取野生型黑腹果蝇 W1118 基因组 DNA，具体方法见第二章 2.10.2.

2.3.2 左右同源臂扩增

以基因组 DNA 为模板，用的是 NEB 公司的 KOD FX 扩增左右同源臂，具体步骤如下：

2 x reacton buffer	25 μL
2 mM dNTPs	10 μL
10 mM primer F	1.5 μL
10 mM primer R	1.5 μL
DNA	X μL(200 ng)
KOD FX DNA Polymerase	1 μL
ddH ₂ O	至 50 μL

反应程序：94℃ 2 min；98℃ 10s，55℃ 30 s，68℃ 40 s 40 个循环；68℃ 10 min；12℃ forever。

表 3.1 *CG18208* 同源臂扩增引物

Table 3.1 Primers for cloning <i>CG18208</i> homology hands	
引物名称	引物序列(5'- 3')
Primer name	Primer sequence(5'- 3')
CG18208-Left-F	GAGGCCCTTTCGTCTTCAAGATTCCCCACGGTGGAAAACGACA
CG18208-Left-R	GGCGGGCGGATCTGCTAGCGTGTGATCGTAATAGTGATCGTGA
CG18208-Right-F	GAGGCCCTTTCGTCTTCAAGCGATGGACGTCCTCCTCTGCACC
CG18208-Right-R	GGCGGGCGGATCTGCTAGCGCAAGGCATCGCCGAATCATCTGA

2.3.3 载体质粒酶切

左臂用 *kpn* I 和 *Eco*R I 对载体进行双酶切，右臂用 *Sac* II 对载体单酶切：

<i>kpn</i> I	1 μL
<i>Eco</i> R I	1 μL
26229 质粒	1 μg
10 X 反应缓冲液	4 μL
Water	至 20 μL

37°C 孵育 2h，之后 65°C 10min 失活。

<i>Sac</i> II	1 μL
26229 质粒	1 μg
10 X 反应缓冲液	4 μL
Water	至 20 μL

37°C 孵育 2 h，之后 65°C 10 min 失活。

2.3.4 左右同源臂与载体连接

使用 Vazyme 公司的 ClonExpress II One Step Cloning Kit 试剂盒将扩增的左右同源臂分别依次连接到载体相应位点，具体程序如下：

ddH ₂ O	Up to 20 μL
5 X CE II Buffer	4 μL
线性化克隆载体	50-200 ng
插入片段扩增产物	20-200 ng
Exnase II	2 μL

最适载体使用量=[0.02x 克隆载体碱基对数]ng

最适片段使用量=[0.03x 插入片段碱基对数]ng

体系配制完成后用移液器上下吸打混匀，避免产生气泡(避免剧烈震荡或者涡旋混匀)。37°C 反应 30 min，待反应完成后立即置于冰上冰浴 5 min。

2.3.5 连接产物转化

具体步骤同第二章 2.7.6。

2.3.6 转化子的鉴定和测序

- (1)用灭菌的 10 μL 枪头在 LB 平板上挑取 5 个白色单菌落，分别接种于 1 mL 含 Amp (100 μg/mL)抗性的 LB 液体培养基中，37°C，200 rpm 振荡培养；
- (2)以培养的菌液为模板，进行菌落 PCR 验证，PCR 反应体系为 25 μL，如下：

Super mix	12.5 μL
10 mM primer F	1 μL
10 mM primer R	1 μL
菌液	1 μL
ddH ₂ O	至 25 μL

- PCR 反应条件为：94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 40 s, 30 cycles; 72°C 10 min, 12°C forever。
- (3)跑电泳检测，并将 500 bp 左右有条带的菌液送测序。

2.4 pCFD5-OA3 质粒制备

2.4.1 pCFD5 载体酶切、纯化

用 Bbs I 处理 8 μg pCFD5 质粒，之后纯化载体，具体方法同第三章 2.5，确保载体终浓度在 50-200 ng/μL。

2.4.2 设计引物，同时插入 4 个 gRNA 片段

表 3.2 *CG18208* gRNA 克隆引物

Table 3.2 Primers for cloning *CG18208* gRNA

引物名称	引物序列(5'- 3')
Primer name	Primer sequence(5'- 3')
OA3-fragment1-F1	GCGGCCCGGGTTCGATTCCCGGCCGATGCAGATGTTGCCCGTATTGA TGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
OA3-fragment1-R1	GCCGAGGAGCGGCGGTATGCTGCACCAGCCGGAATCGAACCC
OA3-fragment2-F2	GCATACCGCCGCTCCTCGGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
OA3- fragment2-R2	CTGGGATGGCCGGTATCCCATGCACCAGCCGGAATCGAACCC
OA3- fragment3-F3	TGGGATACCGCCATCCCAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
OA3- fragment3-R3	ATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACTCGCGGAGTGGATGTCAC ACTGCACCAGCCGGAATCGAACCC

2.4.3 片段扩增，跑胶纯化

以 PCFD5 为模板，使用 NEB 公司的 Q5 高保真酶，用上述引物对各片段进行特异性扩增。之后进行 1%的凝胶电泳，扩增得到的各片段大小分别为：fragment1 234 bp、fragment2 204 bp、fragment3 234 bp。然后进行切胶回收，纯化产物。具体操作同第二章 2.5.2。

2.4.4 连接、转化

使用 NEB 公司的 Gibson Assembly 试剂盒同时将三个片段连接到酶切好的载体上。总体积为 15 μL，其中包含 50 ng 载体，2 倍的 DNA 片段含量，7.5 μL 2x Gibson Assembly Master Mix。50°C 反应 1 h 之后将连接载体转化到感受态细胞中。

2.4.5 转化子的鉴定和测序

具体操作步骤同第二章，测序引物如下：

表 3.3 *CG18208* gRNA 测序引物

Table 3.3 Primers for *CG18208* gRNA sequencing

引物名称	引物序列(5'- 3')
Primer name	Primer sequence(5'- 3')
PCFD5-CEXU-F	ACGTTTATATACTTATGCCCCCTAAG
PCFD5-CEXU-R	GCACAATTGTCTAGAATGCATAC

2.5 果蝇胚胎显微注射

将 400 ng/μL 的 pCFD5-OA3 质粒和 200 ng/μL 的 donor 质粒同时注射到生殖细胞特异表达 Cas9 的果蝇 51323 早起胚胎内。具体操作步骤同第二章 2.9。

2.6 *CG18208* 突变检测

2.6.1 果蝇交配策略

注射后的 G0 代雌性果蝇与三号染色体平衡子 TM3/TM6 雄性果蝇杂交，G0 代雄性果蝇与 TM3/TM6 雌性果蝇杂交，分别筛选后代红眼表型。

2.6.2 G0 代突变体筛选

- (1)首先提取单头 G0 代果蝇 DNA，具体操作步骤同第二章 2.10.2
- (2)以基因组 DNA 为模板,使用 Q5 高保真酶对靶位点附件的 1000 bp 左右的 DNA 片段进行特异性扩增。具体操作同第二章 2.10.2，扩增引物如下：

表 3.4 *CG18208* 突变区域 PCR 引物

Table 3.4 Primers for cloning *CG18208* mutant region

引物名称	引物序列(5'- 3')
Primer name	Primer sequence(5'- 3')

CG18208-jiance-F	ATAAGCGAAATAATATGCGAATG
CG18208-jiance -R	GCAGCACACACGATGCTTTTCAA

- (1) 将 PCR 产物送生工生物工程有限公司测序。
- (2) TIDE 方法检测突变, 将对照测序组测序结果、实验组测序结果以及 gRNA 序列上传到网站(<https://tide-calculator.nki.nl/>)上算法首先将 gRNA 连接到对照组序列上, 确定切割位点, 之后将对照组酶切位点上游序列与实验组比对, 查找是否存在序列不同。TIDE 通过分析每个碱基的峰对确定是否存在与对照不同的序列。
- (3) HRMA 方法检测 G0 代 indel 突变

以基因组 DNA 为模板, 扩增 gRNA 靶位点上下游 150 bp 的片段, 使用 CFX96 实时定量体系读取靶位点的溶解曲线, 按如下体系配制:

SoFast Eva Green supermix	10 μL
DNA	1 μL
Melt calibration primer F	0.75 μg
Melt calibration primer R	0.75 μL
ddH ₂ O	至 20 μL

反应程序如下:

Cycling step	Temperature	Time	Number of cycles
Enzyme activation	98°C	2 min	1
Denaturation	98°C	5 s	40
Annealing/extension	55°C	10 s	
	95°C	1 min	
	70°C	1 min	1
Melt curve	70-95°C(in 0.2°C increments)	10 s	

表 3.5 实时荧光定量 PCR 引物

Table 3.5 Primers for real-time quantitative

引物名称	引物序列(5'- 3')
Primer name	Primer sequence(5'- 3')

CG18208-gRNA1-F	GCCACGCATCCACAAAGTTA
CG18208-gRNA1-R	GGATTGAGGGTGGCATTGTC
CG18208-gRNA2-F	TTCCGGGGCGACATCGGGCAATT
CG18208-gRNA2-R	TTGCCACCACGATGATAATCAT
CG18208-gRNA3-F	GGCGGTGGCCGACTTCTTTCTGG
CG18208-gRNA3-R	AGGTTCATGATCGAGGCGGTGCA
CG18208-gRNA4-F	GACTATCTGAAGTCGAGAACGCC
CG18208-gRNA4-R	GCCACTTACCTCGCACTTGGGCA

(4) 用 Presion Melt Analysis software 对数据进行分析

3 结果与分析

3.1 *CG18208* CDS 序列分析和靶位点选择

为了使 Gal4 在果蝇体内的表达与 *CG18208* 一致，在第一个外显子上找了 4 个 gRNA 靶位点，且第一个 gRNA 靶位点尽量靠近起始密码子 ATG(图 3.1)。

ATGGATTATAGCCGACTGAATGCCAACATCAATACGGGCAACATCAGCACC
GATGACTTTCTGGCCGTCTTCTCGACCGAAAGCCGGACAATGCCACCCTC
AATCCGCCCTGTCTCAGTGTCTGATGGTCAGCTGACCCTGCCGCCGGGATCG
GGATATGTCAATGTCAACGATACGATATTCTTCCTGAATGGCAGCTTCTACA
ACAGCAGCCTGCAGCTGGCGGCGGGATTCTATAATCAAAGCAGTGCTTCCG
GGGCGACATCGGGCAATTTGACCAATCCGAATCACACAGAAGTCACTGG
GATGGCCGGTATCCCAATGGATATACGCTTACGCACATCGTGATCGCCTCCA
TTATTGTGACGATCCTGATGATTATCATCGTGGTGGGCAACATGCTGGTGAT
CATAGCCATTGCCACGGAGAAGTCGTTGAAGAATATACAGAACTGGTTCAT
TGCCTCGTTGGCGGTGGCCGACTTCTTTCTGGGCCTCATCATGCCATTT
TCGCTGGCCAATGAGCTAATGGGCTACTGGATCTTCGGCAGCTGGTGGTGT
GACATCCACTCCGCGATGGACGTCTCTCTGCACCGCCTCGATCATGAAC
CTGTGCCTCATCTCGTTAGATCGCTACTGGAGCATCACCAAGGCCGTCGACT

ATCTGAAGTCGAGAACGCCGGCGCGAGCCGCGTCATGATCACGCTCAGT
CTGGATTATGTCCGCCCTCATCTGCATACCGCCGCTCCTCGGCTGGAAAGGTG
AAGATGCCAGAGGGACCGCTGCCCAAGTGCGA

注：红色字体为 NGG 或者反向互补序列 CCN，橘色字体为 gRNA 或反向互补序列。

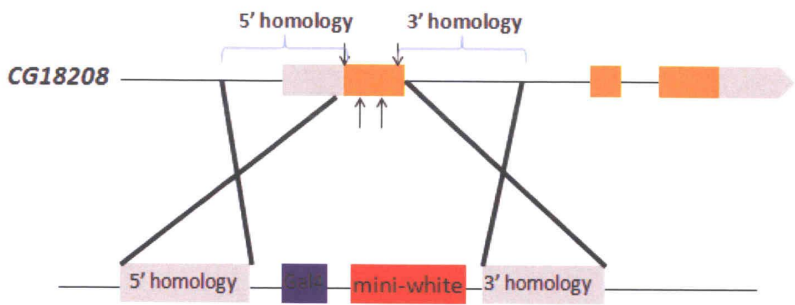


图 3.1 *CG18208* 打靶位点
Fig 3.1 Targeted site of *CG18208*

3.2 pCFD5-OA3 载体制备

使用 NEB 公司的 Gibson Assembly 试剂盒,通过一步克隆同时将 4 个 gRNA 连接到载体里。使 PCFD5-OA3 质粒含有一个 dU6-3:tRNA:gRNA:tRNA:gRNA 结构，在 U6:3 启动子的作用下启动转录，之后通过生物体内在的 tRNA 剪切机制得到多个 gRNA。

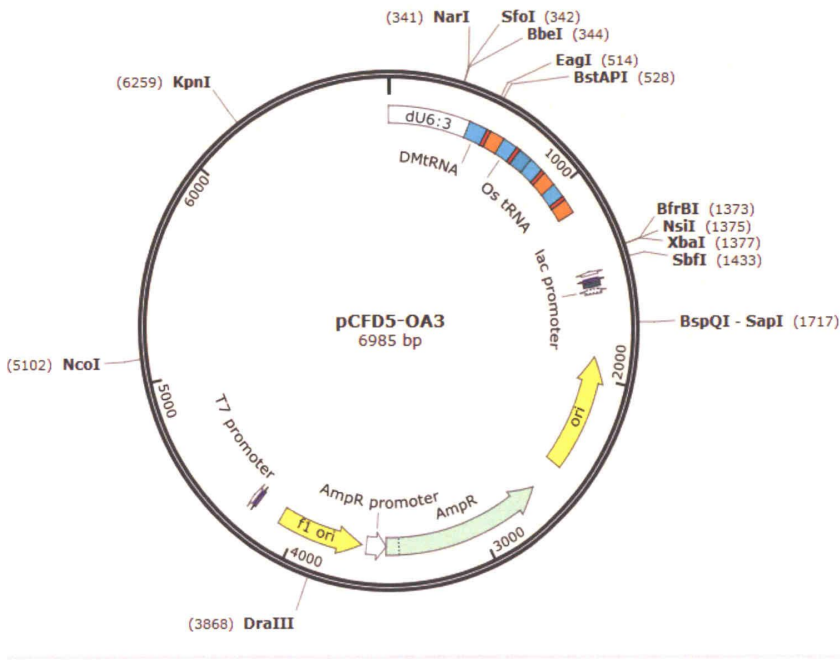


图 3.2 pCDF5-OA3 质粒图谱

Fig 3.2 The Physical map of the pCDF5-OA3 plasmind

注：质粒图谱中，蓝色区域代表 tRNA，红色跟橘色区域为 gRNA+gRNA scaffold

3.3 G0 代果蝇突变检

对 G0 果蝇突变区域 PCR 扩增产物测序结果，显示有 2 头果蝇测序结果第一个 gRNA 位点有双峰如图 3.3(A)，TIDE 检测同样显示在第一个 gRNA 位点处存在双峰如图 3.4(A)；另外多头果蝇在 ATG 处开始存在双峰如图 3.3(B)，TIDE 结果同样显示在相同位置存在异常 如图 3.4(B)。

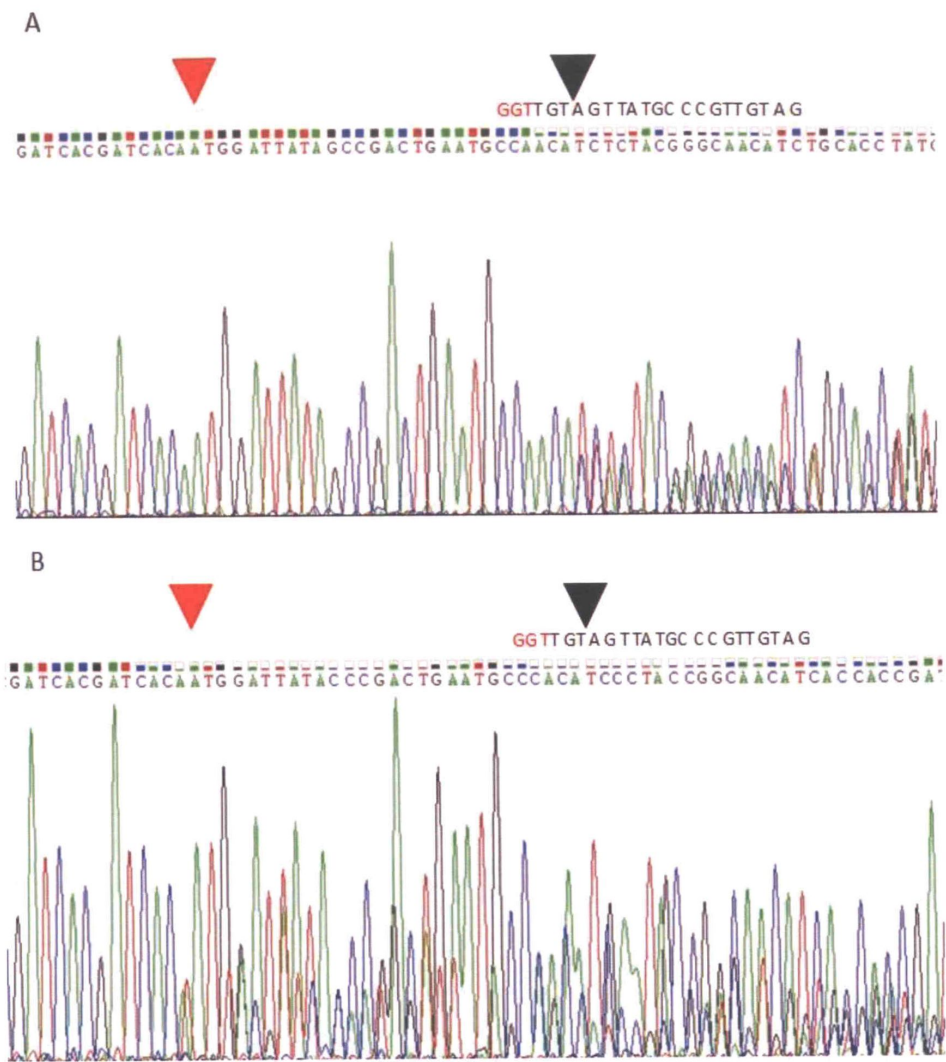


图 3.3 G0 代测序峰图

Fig3.3 Sequence graphics of G0 *CG18208*. (A) Indel started from the start codon. (B) Indel started from the cut site.

注：红色箭头代表转录起始位点，黑色箭头代表切割位点。

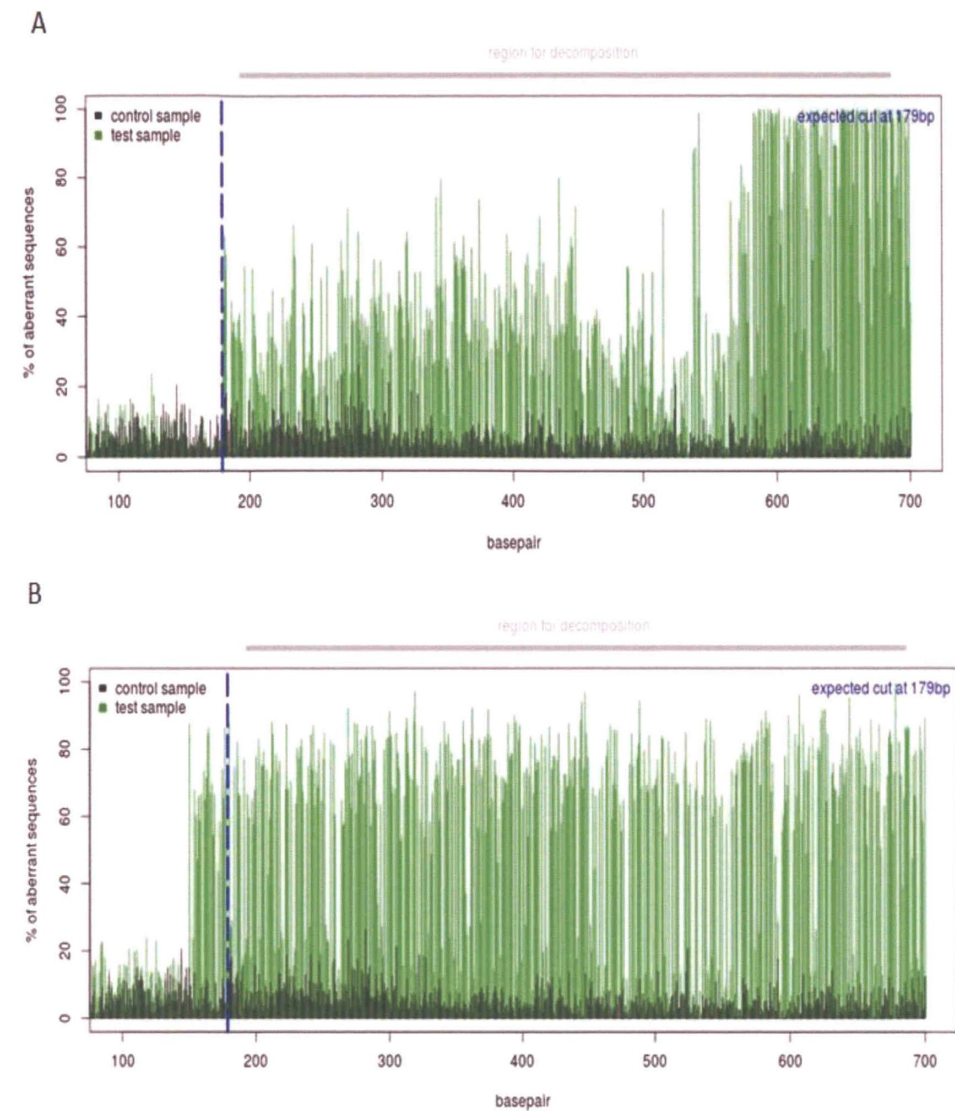


图 3.6 G0 代测序峰图 TIDE 分析

Fig 3.6 Application of TIDE to G0 DNA sequence. (A) Aberrant nucleotide signal started from cut site. (B) Aberrant nucleotide signal started from start codon.

注：绿色为 G0 代测序结果，黑色为对照，蓝色虚线为预测切点，灰色表示溶解区域。

3.4 HRMA 分析结果

为了进一步检测各靶位点突变情况，设计了 4 对引物对靶位点附近 100 bp 左右的序列进行高溶解曲线分析。通过标准化的分析使所有的曲线的起始荧光信号和终止荧光信号相同。结果显示在 OA3-1(图 3.7A), OA3-2(图 3.7C),OA3-3(图

3.7E)处均可以考到不同的曲线，表明这三处位点均有 indel 产生，然而 OA3-4 处没有看到不同曲线。通过直观的荧光峰图显示相同的结果（图 B、D、E）。

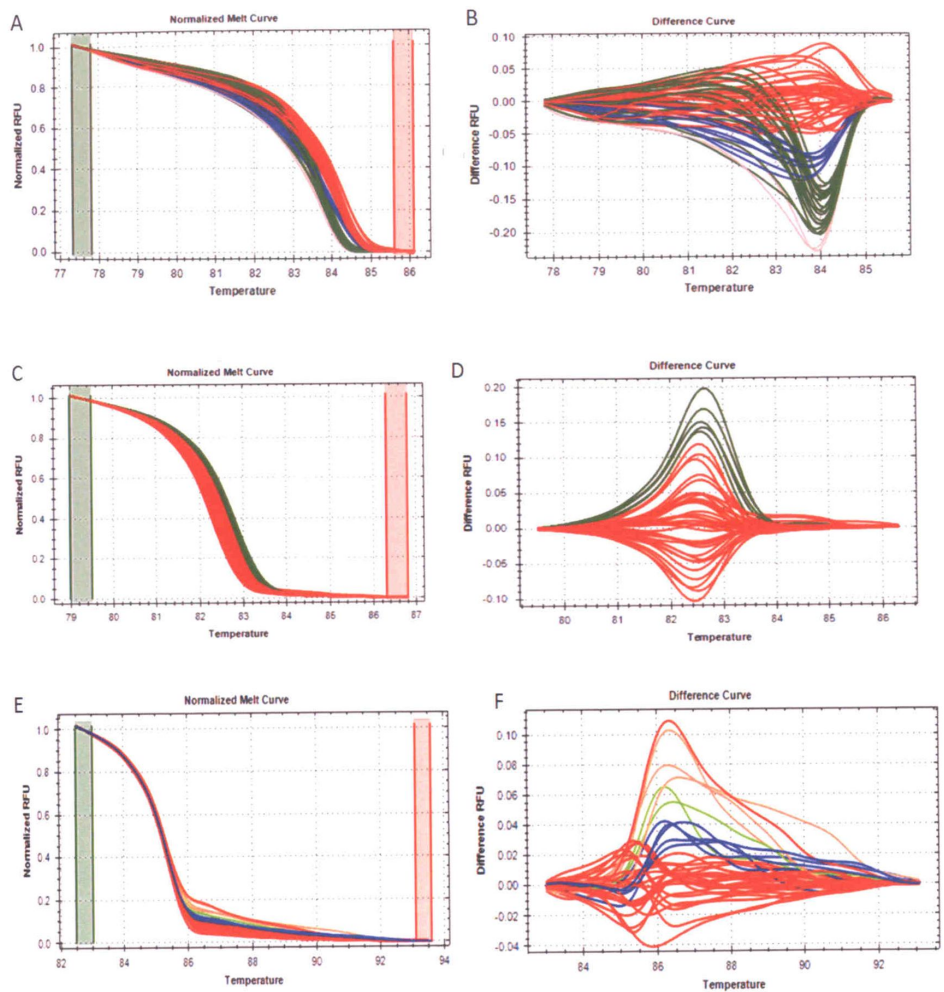


图 3.7 高溶解曲线分析

Fig 3.7 High resolution melt analysis(HRMA) of G0 *CG18208* mutant. (A) High resolution of G0 flies at OA3-1 site. (B) Difference of flourencece curve for each well in (A). High resolution of G0 flies at OA3-2 site. (D) Difference of flourencece curve for each well in(C). High resolution of G0 flies at OA3-3 site. (F) Difference of flourencece curve for each well in(E).

4 讨论

本研究中,我们通过分析果蝇 *CG18208* 基因 CDS 序列,在其第一个外显子据起始位点 22 个碱基的位置设计了第一个 gRNA,并在之后陆续设计了 3 个 gRNA,将 4 个 gRNA 同时克隆的 pCFD5 质粒中,使其具备 tRNA-gRNA 结构,可以在转录得到的单一转录本后利用生物体内在的 tRNA 剪切机制,同时得到 4 个 gRNA,实现多位点打靶。另外,本研究中还制备了有 donor 质粒含有 *CG18208* 基因靶位点左右 1 kbp 的同源序列。将两个质粒同时注射到生殖细胞系特异表达 Cas9 的果蝇早期胚胎中。之后,我们通过 sanger 测序、TIDE 检测方法初步检测到 G0 代突变果蝇,并通过 HRMA 方法精确地在 G0 代检测到靶位点的突变。

章鱼胺通过特定的章鱼胺受体在昆虫几乎所有的生理过程中都发挥重要作用,目前已经对部分章鱼胺受体发挥生理功能的机制进行了研究。但是对最新发现的章鱼胺受体 OA3 的生理功能还没有任何报道,为了研究果蝇新型章鱼胺受体 OA3 的生理功能,本研究通过多位点打靶技术,得到 *CG18208* 突变体果蝇,但是由于时间限制,功能研究还未展开。

总结

1 本研究的创新之处

- (1) 利用 pDCC6 质粒同时表达 Cas9 mRNA 和 gRNA, 对果蝇基因组进行编辑, 只需要将 gRNA 克隆到 pDCC6 载体里即可, 无需体外制备 Cas9 mRNA 和 gRNA, 操作简便, 且避免 RNA 降解问题。
- (2) 利用 tRNA-gRNA 技术, 实现多位点打靶。

2 本研究存在的问题

- (1) 本研究中未能检测到 *CG18208* G1 代突变体。
- (2) 未能对 *CG18208* 基因功能做进一步研究。

3 今后的研究方向

- (1) 利用 *CG18208* 突变体果蝇, 对章鱼胺 OA3 受体的生理功能展开研究。
- (2) 利用 tRNA-gRNA 系统研究提高同源重组突变效率的方法。
- (3) 利用 tRNA-gRNA 技术, 同时打靶多个基因, 研究多基因决定的生理功能。

参考文献

- 黄敏, 缪泽鸿, 丁健. 2007. DNA 双链断裂损伤修复系统研究进展. 生理科学进展, 38: 295-300.
- 芦广庆, 段金志, 张昱. 2016. 哺乳动物 DNA 连接酶在 DNA 双链断裂修复通路中的作用. 遗传, 38: 178-179.
- 吴顺凡, 郭建洋, 黄佳, 叶恭银. 2010. 昆虫体内章鱼胺和酪胺的研究进展. 昆虫学报, 53: 1157-1166.
- 武亚苏. 2015. 甲脒类杀虫剂分子靶标的探究. 硕士学位论文, 浙江大学, 杭州.
- Bacon, J. P., Thompson, K. S. and Stern, M. 1995. Identified octopaminergic neuro provide an arousal mechanism in the locust brain. *Journal of Neurophysiology*, 74, 2739-2743.
- Balfanz, S., Strücker, T., Frings, S. and Baumann, A. 2005. A family of octopamine receptors that specifically induce cyclic AMP production or Ca^{2+} release in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neurochemistry*, 93, 440-451.
- Baines, D. and Downer, R. G. 1994. Octopamine enhances phagocytosis in cockroa hemocytes: involvement of inositol trisphosphate. *Archive of Insect Biochemistry and Physiology*, 26, 249-261.
- Barbezier, N., Canino, G., Rodor, J., Jobet, E., Saez-Vasquez, J., Marchfelder, A. and Echeverría, M. 2009. Processing of a dicistronic tRNA-snoRNA precursor: combined analysis in vitro and in vivo reveals alternate pathways and coupling to assembly of snoRNP. *Plant Physiology*, 150, 1598-1610.
- Barrangou, R., Fremaux, C. and Deveau, H. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315, 1709-12.
- Barron, A. B., R. Maleszka, R., Vander Meer, R. K. and Robinson, G. E. 2007. Octopamine modulates honey bee dance behavior. *Processing National Academy of Science*, 104, 1703-7.
- Bassett, A. R., Tibbit, C., Ponting, C. P. and Liu, J. L. 2013. Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell Reports*, 4, 220-8.
- Bassett, A. R., Tibbit, C., Ponting, C. P. and Liu, J. L. 2014. Mutagenesis and homologous

- recombination in *Drosophila* cell lines using CRISPR/Cas9. *Biology Open*, 3, 42-49.
- Bau, D. T., Fu Y. P., Chen, S. T., Cheng, T. C., Yu, J. C., Wu, P. E. and Shen, C. Y. 2004. Breast cancer risk and the DNA double-strand break end-joining capacity of nonhomologous end-joining genes are affected by BRCA1. *Cancer Research*, 64, 5013-5019.
- Bau, D. T., Mau, Y. C. and Shen, C. Y. 2005. The role of BRCA1 in non-homologous end-joining. *Cancer Letter*, 240,1-8.
- Beumer, K. J., Trautman, J. K., Mukherjee, K. and Carroll, D. 2013. Donor DNA utilization during gene targeting with zinc-finger nucleases. *G3 Bethesda*, 3, 657-664.
- Blenau, W., Balfanz, S. and Baumann, A. 2000. Amtyr1: characterization of a gene from honeybee *Apis mellifera* brain encoding a functional tyramine receptor. *Journal of Neurochemistry*, 74, 900-908.
- Bibikova, M., Carroll, D., Segal, D. J., Trautman, J. K., Smith, J., Kim, Y. G. and Chandrasegaran, S. 2001. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Molecular and Cellular Biology*, 21, 289-97.
- Bibikova, M., Beumer, K., Trautman, J. K. and Carroll, D. 2003. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science*, 300, 764.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A. and Bonas, U. 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326, 1509-1512.
- Branzei, D. and Foiani, M. 2008. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 297-308.
- Brouns, S. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J., Snijders, A. P., Dickman, M. J., Makarova, K. S. and Koonin, E. V. 2008. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 21, 960-964.
- Burma, S., Chen, B. P. and Chen, D. J. 2006. Role of non-homologous end joining NHEJ in maintaining genomic integrity. *DNA Repair*, 5, 1042-1048.
- Burrell, B. D. and Smith, B. H. 1995. Modulation of the honey bee *Apis mellifera* sting response by octopamine. *Journal of Insect Physiology*, 41, 671-680.
- Canino, G., Bocian, E., Barbezier, N., Echeverría, M., Forner, J., Binder, S. and Marchfelder, A. 2009. Arabidopsis encodes four tRNase Z enzymes. *Plant Physiology*, 150, 1494-1502.

- Capecchi, M. R.** 1980. High efficiency transformation by direct microinjection DNA into cultured mammalian cells. *Cell*, 22, 479-488.
- Capecchi, M. R.** 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science*, 244, 1288-1292.
- Carte, J., Wang, R., Li, H., Terns, R. M. and Terns, M. P.** 2008. Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes & Development*, 22, 3489-3496.
- Choulika, A., Perrin, A., Dujon, B., and Nicolas, J. F.** 1995. Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cell Biology*, 15, 1968-1973.
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E. L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A. J. and Voytas, D. F.** 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186, 757-761.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini L. A. and Zhang, F.** 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339, 819-823.
- Crocker, A., Shahidullah, M., Levitan, I. B. and Sehgal, A.** 2010. Identification of Neural Circuit that Underlies the Effects of Octopamine On Sleep:Wake Behavior. *Neuron*, 65, 670-81.
- Davis, R. L.** 1996. Physiology and biochemistry of *Drosophila* learning mutants. *Physiol Review*, 76, 299-317.
- De Cesare, D., Fimia, G. M. and Sassone-Corsi, P.** 1999. Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. *Trends in Biochemical Sciences*, 24, 281-285.
- Defazio, L. G., Stansel, R. M. and Griffith, J. D.** 2002. Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *The EMBO Journal*, 21, 3192-3200.
- Deveau, H., Garneau, J. E. and Moineau, S.** 2010. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annual Review of Microbiology*, 64, 475-493.
- Dieci, G., Fiorino, G., Castelnovo, M., Teichmann, M. and Pagano, A.** 2007. The expanding RNA polymerase III transcriptome. *Trends in Genetics*, 23, 614-622.
- Dudasova, Z., Dudas, A. and Chovanec, M.** 2004. Non-homologous end-joining factors of

- Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 581-601.
- Duportets, L., Barrozo, R. B., Bozzolan, F., Gaertner, C., Anton, S., Gadenne, C. and Debernard, S.** 2010. Cloning of an octopamine/tyramine receptor and plasticity of its expression as a function of adult sexual maturation in the male moth *Agrotis ipsilon*. *Insect Molecular Biology*, 19, 489-499.
- Evans, P. D. and Maqueira, B.** 2005. Insect octopamine receptors: a new classification scheme based on studies of cloned *Drosophila* G-protein coupled receptors. *Invertebrate Neuroscience*, 5, 111-118.
- Ewart, G. D. and Howells, A. J.** 1998. ABC transporters involved in transport of eye pigment precursors in *Drosophila melanogaster*. *Methods Enzymol*, 292, 213-224.
- Farooqui, T.** 2012. Review of octopamine in insect nervous system. *Open Access Insect Physiology*, 4, 1-7.
- Fu, Y., Foden, J. A., Khayter, C., Maeder, M. L., Reyon, D., Joung, J. K. and Sander, J. D.** 2013. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 31, 822-826.
- Garneau, J. E., Dupuis, M. È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A. H. and Moineau, S.** 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468, 67-71.
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V.** 2012. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Processing of the National Academy of Science*, 109, E2579-E2586.
- Gilles, A. F., Schino, J. B. and Averof, M.** 2015. Efficient CRISPR-mediated gene targeting and transgene replacement in the beetle *Tribolium castaneum*. *Development*, 142, 2832-9.
- Gottesman, S.** 2011. Microbiology: Dicing defence in bacteria. *Nature*. 471,588-9.
- Gratz, S. J., Cummings, A. M., Nguyen, J. N., Hamm, D. C., Donohue, L. K., Harrison, M. M., Wildonger, J. and O'Connor-Giles, K. M.** 2013. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics*, 194, 1029-1035.
- Grohmann, L., Blenau, W., Erber, J., Ebert, P. R., Strünker, T. and Baumann, A.** 2003. Molecular and functional characterization of an octopamine receptor from honeybee *Apis mellifera* brain. *Journal of Neurochemistry*, 86, 725-735.

- Gudermann, T., Kalkbrenner, F. and Schultz, G. 1996. Diversity and electivity of receptor-G protein interaction. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 36, 429-459.
- Gudermann, T., Schöneberg, T. and Schultz, G. 1997. Functional and tructural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annual Review of Neuroscience*, 20, 399-427.
- Gutmann, B., Gobert, A. and Giegé, P. 2012. PRORP proteins support RNase P activity in both organelles and the nucleus in Arabidopsis. *Genes & Development*. 26, 1022-1027.
- Haber, J. E. and Leung, W. Y. 1996. Lack of chromosome territoriality in yeast: promiscuous rejoining of broken chromosome ends. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 13949-13954.
- Haft, D. H., Selengut, J., Mongodin, E. F. and Nelson, K. E. 2005. A guild of 45 CRISPR-associated Cas protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Computation Biology*, 1, e60.
- Han, K. A., Millar, N. S. and Davis, R. L. 1998. A novel octopamine receptorwith preferential expression in Drosophila mushroom bodies. *Journal of Neuroscience*, 18, 3650-3658.
- Haurwitz, R. E., Jinek, M., Wiedenheft, B., Zhou, K. and Doudna, J. A. 2010. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science*, 329, 1355-1358.
- Holliday, R. 2007. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genetic Research*, 89, 285-307.
- Hou, L., Jiang, F., Yang, P., Wang, X. and Kang, L. 2015. Molecular characterization and expression profiles of neuropeptide precursors in the migratory locust. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 63, 63-71.
- Houtgraaf, J. H., Versmissen, J. and van der Giessen, W. J. 2006. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovascular Revascularization Medicine*, 7, 165- 172.
- Hsu, P. D., Lander, E. S. and Zhang, F. 2014. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*, 6, 1262-1278.
- Huang, Y., Chen, Y., Zeng, B., Wang, Y., James, A. A., Gurr, G. M., Yang, G., Lin, X., Huang, Y and You, M. 2016. CRISPR/Cas9 mediated knockout of the abdominal-A homeotic gene in the global pest, diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 75, 98-106.

- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. and Nakata, A. 1987. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriol*, 169, 5429-33.
- Jackson, S. P. 2002. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, 23, 687-696.
- Jansen, R., Emden, J. D., Gaastra, W. and Schouls, L. M. 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43, 1565-1575.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. and Charpentier, E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337, 816-21.
- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E. and Doudna, J. 2013. RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife*, 2, e00471.
- Karren, P. 2000. DNA double strand break repair in mammalian cells. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10, 144-150.
- Kim, Y. C., Lee, H. G., Lim, J. and Han, K. A. 2013. Appetitive Learning Requires the Alpha1-Like Octopamine Receptor OAMB in the *Drosophila* MushroomBody Neurons. *Journal of Neuroscience*, 33, 1672-1677.
- Kim, G. S. and Kim, Y. 2010. Up-regulation of circulating hemocyte population in response to bacterial challenge is mediated by octopamine and 5-hydroxytryptamine via Rac1 signal in *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology*, 56, 559-566.
- Kondo, S. and Ueda, R. 2013. Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*. *Genetics*, 195, 715-721.
- Konermann, S., Brigham, M. D., Trevino, A. E., Hsu, P. D., Heidenreich, M., Cong, L., Platt, R. J., Scott, D. A., Church, G. M. and Zhang, F. 2013. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. *Nature*, 500, 472-476.
- Kruszka, K., Barneche, F., Guyot, R., Ailhas, J., Meneau, I., Schiffer, S. and Marchfelder, A. and Echeverría, M.. 2003. Plant dicistronic tRNA-snoRNA genes: A new mode of expression of the small nucleolar RNAs processed by RNase Z. *The EMBO Journal*, 22, 621-632.
- Lee, H. G., Seong, C. S., Kim, Y. C., Davis, R. L. and Han, K. A. 2003. Octopamine receptor

- OAMB is required for ovulation in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 264, 179-190.
- Li, Y., Zhang, J., Chen, D., Yang, P., Jiang, F., Wang, X. and Kang, L.** 2016. CRISPR/Cas9 in locusts: Successful establishment of an olfactory deficiency line by targeting the mutagenesis of an odorant receptor co-receptor Orco. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 79, 27-35.
- Lim, J., Sabandal, P. R., Fernandez, A., Sabandal, J. M., Lee, H. G., Evans, P. and Han, K. A.** 2014. The octopamine receptor Oct β 2R regulates ovulation in *Drosophila melanogaster*. *Plos One*, 9, e104441.
- Lu, G., Duan, J., Shu, S., Wang, X. X., Gao, L., Guo, J. and Zhang, Y.** 2016. Ligase I and ligase III mediate the DNA double-strand break ligation in alternative end-joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 1256-1260.
- Mackenzie, S. M., Howells, A. J., Cox, G. B. and Ewart, G. D.** 2000. Sub-cellular localisation of the white/scarlet ABC transporter to pigment granule membranes within the compound eye of *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, 108, 239-252.
- Maeder, M. L., Linder, S. J., Cascio, V. M., Fu, Y., Ho, Q. H. and Joung, J. K.** 2013. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nature Methods*, 10, 977-979.
- Mali, P., Aach, J., Stranges, P. B., Esvelt, K. M., Moosburner, M., Kosuri, S., Yang, L. and Church, G. M.** 2013b. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nature Biotechnology*, 31, 833-838.
- Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I. and Koonin, E. V.** 2006. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct*, 16, 1-7.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E. and Church, G. M.** 2013a. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339, 823-6.
- Maqueira, B., Chatwin, H. and Evans, P. D.** 2005. Identification and characterization of a novel family of *Drosophila* β -adrenergic-like octopamine G-protein coupled receptors. *Journal of Neurochemistry*, 94, 547-560.

- Martin, J. R., Raabe, T. and Heisenberg, M.** 1999. Central complex substructures are required for the maintenance of locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology*, 185, 277-288.
- Miller, J. C., Holmes, M. C., Wang, J., Guschin, D. Y., Lee, Y. L., Rupniewski, I., Beausejour, C. M., Waite, A. J., Wang, N. S., Kim, K.A., Gregory, P. D., Pabo, C. O. and Rebar, E. J.** 2007. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nature Biotechnology*, 25, 778-785.
- Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., Meng, X., Paschon, D. E., Leung, E., Hinkley, S. J., Ankoudinova, I., Cost, G. J., Urnov, F. D., Zhang, H. S., Holmes, M. C., Zhang, L., Gregory, P. D. and Rebar, E. J.** 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology*, 29, 143-148.
- Mimori, T. and Hardin, J. A.** 1986. Mechanism of Interaction between Ku Protein and DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 261, 376-379.
- Mizunami, M. S., Unoki, Y., Mori, D., Hirashima, A., Hatano. and Matsumoto, Y.** 2009. Roles of Octopaminergic and Dopaminergic Neurons in Appetitive and Aversive Memory Recall in an Insect. *BMC Biology*, 4, 7-46.
- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. and Soria, E.** 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60, 174-182.
- Moscou, M. J. and Bogdanove, A. J.** 2009. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 326, 1501.
- Myers, E. W., Sutton, G. G., Delcher, A. L., Dew, I. M., Fasulo, D. P., Flanigan, M. J., Kravitz, S. A., Mobarry, C. M., Reinert, K. H., Remington, K. A., Anson, E. J., Bolanos, R. A., Chou, H. H., Jordan, C. M., Halpern, A. L., Lonardi, S., Beasley, E. M., Brandon, R. C., Chen, L., Dunn, P. J., Lai, Z., Liang, Y., Nusskern, D. R., Zhan, M., Zhang, Q., Zheng, X., Rubin, G. M., Adams, M. D. and Venter, J. C.** 2000. A whole genome assembly of *Drosophila*. *Science*, 287, 2196-204.
- Nagaya, Y., Kutsukake, M., Chigusa, S. I. and Komatsu, A.** 2002. A tramine, tyramine, functions as a neuromodulator in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neuroscience*, 22, 324-328.

- O'Dell, K. M. 1993. The effect of the inactive mutation on longevity, sex, rhythm and resistance to p-cresol in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 70, 393-399.
- Ohhara, Y., Shimada-Niwa, Y., Niwa, R., Kayashima, Y., Hayashi, Y., Akagi, K., Ueda, H., Yamakawa-Kobayashi, K. and Kobayashi, S. 2014. Autocrine regulation of ecdysone synthesis by β 3-octopamine receptor in the prothoracic gland is essential for *Drosophila* metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 1452-1457.
- Ohta, H., Utsumi, T. and Ozoe, Y. 2003. B96Bom encodes a *Bombyx mori* tyramine receptor negatively coupled to adenylate cyclase. *Insect Molecular Biology*, 12, 217-223.
- Ohtani, A., Arai, Y., Ozoe, F., Ohta, H., Narusuye, K., Huang, J., Enomoto, K., Kataoka, H., Hirota, A. and Ozoe, Y. 2006. Molecular cloning and heterologous expression of an alpha adrenergic-like octopamine receptor from the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*, 15, 763-772.
- Perez, P. P., Kocak, D. D., Vockley, C. M., Adler, A. F., Kabadi, A. M., Polstein, L. R., Thakore, P. I., Glass, K. A., Ousterout, D. G., Leong, K.W., et al. 2013. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nature Methods*, 10, 973-976.
- Phizicky, E. M. and Hopper, A. K. 2010. tRNA biology charges to the front. *Genes & Development*, 24, 1832-1860.
- Plessis, A., Perrin, A., Haber, J. E. and Dujon, B. 1992. Site-specific recombination determined by I-SceI, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease expressed in the yeast nucleus. *Genetics*, 130, 451-460.
- Port, F. and Bullock, S.L.. 2016. augmenting CRISPR applications in *Drosophila* with trna-flanked sgRNAs. *Nature Methods*, 10, 1038.
- Poels, J., Suner, M. M., Needham, M., Torfs, H., De. R. J., De, L. A., Dunbar, S. J. and Vanden, B. J. 2001. Functional expression of a locust tyramine receptor in murine erythroleukemia cells. *Insect Molecular Biology*, 10, 541-548.
- Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Dondna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P. and Lim, W. A. 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 152, 1173-1183.
- Orchard, I. and Lange, A. B. 1985 Evidence for octopaminergic modulation of an insect visceral muscle. *Journal of Neurobiology*, 16, 171-181.

- Reale, V., Hannan, F., Midgley, J. M. and Evans, P. D. 1997. The expression of a cloned *Drosophila* octopamine/tyramine receptor in *Xenopus* oocytes. *Brain Research*, 769, 309-320.
- Ren, X., Sun, J., Housden, B. E., Hu, Y., Roesel, C., Lin, S., Liu, L. P., Yang, Z. Mao, D., Sun, L., Wu, Q., Ji, J. Y., Xi, J., Mohr, S. E., Xu, J., Perrimon, N. and Ni, J. Q. 2013. Optimized gene editing technology for *Drosophila melanogaster* using germ line-specific Cas9. *Processing of National Academy of Science*. 110, 19012-19017.
- Rhee, S. G. and Bae, Y. S. 1997. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 15045-15048.
- Richards, S., Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., Brown, S. J., Denell, R., Beeman, R. W. et al. 2008. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, 452, 949-55.
- Robb, S., Cheek, T. R., Hannan, F. L., Hall, L. M., Midgley, J. M. and Evans, P. D. 1994. Agonist-specific coupling of a cloned *Drosophila* octopamine/tyramine receptor to multiple second messenger systems. *The ENMO Journal*, 13, 1325-30.
- Roeder, T., Seifert, M., Kahler, C. and Gewecke, M. 2003. Tyramine and octopamine: antagonistic modulators of behaviour and metabolism. *Archive of Insect Biochemistry and Physiology*, 54, 1-13.
- Rothkamm, K., Krüger, I., Thompson, L. H., Löbrich, M. 2003. Pathway of DNA double-strand break repair during mammalian cell cycle. *Molecular Cell Biology*, 23, 5706-5715.
- Rouet, P., Smih, F. and Jasin, M. 1994. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Molecular and Cell Biology*. 14, 8096-8106.
- Rudin, N., Sugarman, E. and Haber, J. E. 1989. Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122, 519-534.
- Saparamanas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Hrovath, P. and Siksnys, V. 2011. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 39, 9275-9282.
- Saudou, F., Amlaiky, N., Plassat, J. L., Borrelli, E. and Hen, R. 1990. Cloning and characterization of a *Drosophila* tyramine receptor. *The EMBO Journal*, 9, 3611-3617.

- Schiffer, S., Rösch, S. and Marchfelder, A. 2002. Assigning a function to a conserved group of proteins: The tRNA 3' -processing enzymes. *The EMBO Journal*, 21, 2769-2777.
- Scholz, H., Ramond, J., Singh, C .M. and Heberlein, U. 2000. Functional ethanol tolerance in *Drosophila*. *Neuron*, 28, 261-271.
- Schulz, D. J., Barron, A. B. and Robinson, G. 2002. A role for octopamine in honeybee division of labor. *Brain Behaviour and Evolution*, 60, 350-359.
- Sebo, Z. L., Lee, H. B., Peng, Y. and Guo, Y. 2013. A simplified and efficient germline-specific CRISPR/Cas9 system for *Drosophila* genomic engineering. *Fly Austin*, 8, 52-7.
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., Zhang, K., Liu, J., Xi, J. J., Qiu, J. L., Gao, C. 2013. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31, 686-688.
- Shinohara, A., Ogawa, H. and Ogawa, T. 1992. Rad51 protein involved in repair and recombination in *S.cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell*, 69, 457-470.
- Smith, J., Grizot, S., Arnould, S., Duclert, A., Epinat, J. C., Chames, P., Prieto, J., Redondo, P., Blanco, F. J., Bravo, J., Montoya, G., Pâques, F. and Duchateau, P. 2006. A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Research*, 34, e149.
- Smith, J., Tho, L. M., Xu, N. and Gillespie, D. A. 2010. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Advance in cancer research*, 108, 73-112.
- Sombati, S. and Hoyle, G. 1984a. Generation of specific behaviors in a locust by local release into neuropil of the natural neuromodulator octopamine. *Journal of Neurobiology*, 15, 481-506.
- Sombati, S. and Hoyle, G. 1984b. Central nervous sensitization and dishabituation of reflex action in an insect by the neuromodulator octopamine. *Journal of Neurobiology*, 15, 455-480.
- Stensmyr, M. C. and Hansson, B. S. 2011. A genome benefitting a monarch. *Cell*, 177, 970-2.
- Stewart, G. S., Maser, R. S., Stankovic, T., Bressan, D. A., Kaplan, M. I., Jaspers, N. G. J., Raams, A., Byrd, P. J., Petrini, J. H. J. and Taylor, A. M. R. 1999. The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an Ataxia-Telangiectasia-like disorder. *Journal of Cell Science*, 99, 577-587.
- Summer, K. M., Howells, A. J. and Puliotis, N. A. 1982. Biology of eye pigmentation in insects.

- Advances in Insect Physiology*, 16, 119-166.
- Szostak, J. W., Orr-Weaver, T. L., Rothstein, R. J. and Stahl, F. W. 1983. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell*, 33, 25-35.
- Thomas, K. R., Folger, K. R. and Capecchi, M. R. 1986. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell*, 44, 419-28.
- Uematsu, N., Weterings, E., Yano, K., Morotomi-Yano, K., Jakob, B., Taucher-Scholz, G., Mari, P. O., van Gent, D. C., Chen, B. P. and Chen, D. J. 2007. Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *Journal of Cell Biology*, 177, 219-229.
- Urnov, F. D., Miller, J. C., Lee, Y. L., Beausejour, C. M., Rock, J. M., Augustus, S., Jamieson, A. C., Porteus, M. H., Gregory, P. D. and Holmes, M. C. 2005. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 435, 646-651.
- Vanden, B. J., Vulsteke, V., Huybrechts, R. and De, L. A. 1995. Characterization of a cloned locust tyramine receptor cDNA by functional expression in permanently transformed *Drosophila* S2 cells. *Journal of Neurochemistry*, 64, 2387-2395.
- Verlinden, H., Vleugels, R., Marchal, E., Badisco, L., Tobback, J., Pflüger, H. J., Blenau, W. and Vanden, B. J. 2010 The cloning, phylogenetic relationship and distribution pattern of two new putative GPCR-type octopamine receptors in the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Journal of Insect Physiology*, 56, 868-875.
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F. and Jaenisch, R. 2013a. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 153, 910-918.
- Wang, J., Zhang, H., Wang, H., Zhao, S., Zuo, Y., Yang, Y., Wu, Y. 2016 Functional validation of cadherin as a receptor of Bt toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera* utilizing the CRISPR/Cas9 system. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 76, 11-17.
- Wang, Y., Li, Z., Xu, J., Zeng, B., Ling, L., You, L., Chen, Y., Huang, Y. and Tan, A. 2013b. The CRISPR/Cas9 system mediate efficient genome engineering in *Bombyx mori*. *Cell Research*, 23, 1414-6.
- Weaver, D. T. 1995. What to do at an end: DNA double-strand-break repair. *Trends of Genetic*, 11,

- 388-392.
- Wei, C., Liu, J., Yu, Z., Zhang, B., Gao, G. and Jiao, R. 2013. TALEN or Cas9 rapid, efficient and specific choices for genome modification. *Journal of Genetic & Genomics*, 40, 281-289.
- Werren, J. H., Richards, S., Desjardins, C. A., et al. 2010. Functional and evolutionary insights from the genomes of three parasitoid *Nasonia* species. *Science*, 327, 343-8.
- White, R. J. 2011. Transcription by RNA polymerase III: More complex than we thought. *Nature Reviews Genetic*, 12, 459-463.
- Whim, M. D. and Evans, P. D. 1988 Octopaminergic modulation of flight muscle in the locust. *Journal of Experimental Biology*, 134, 247-266.
- Wu, S. F., Xu, G., Qi, Y. X., Xia, R. Y., Huang, J. and Ye, G. Y. 2014. Two Splicing Variants of a Novel Family of Octopamine Receptors with Different Signaling Properties. *Journal of Neurochemistry*, 129, 37-47.
- Xia, Q., Guo, Y., Zhang, Z., Li, D., Xuan, Z., Li, Z., Dai, F., Li, Y., Cheng, D., Li, R., Cheng, T., Jiang, T., Becquet, C., Xu, X., Liu, C., Zha, X., Fan, W., Lin, Y., Shen, Y., Jiang, L., Jensen, J., Hellmann, I., Tang, S., Zhao, P., Xu, H., Yu, C., Zhang, G., Li, J., Cao, J., Liu, S., He, N., Zhou, Y., Liu, H., Zhao, J., Ye, C., Du, Z., Pan, G., Zhao, A., Shao, H., Zeng, W., Wu, P., Li, C., Pan, M., Li, J., Yin, X., Li, D., Wang, J., Zheng, H., Wang, W., Zhang, X., Li, S., Yang, H., Lu, C., Nielsen, R., Zhou, Z., Wang, J., Xiang, Z. and Wang, J. 2009. Complete resequencing of 40 genomes reveals domestication events and genes in silkworm *Bombyx*. *Science*, 326, 433-6.
- Xie, K., Minkenberg, B. and Yang, Y. 2015. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 3570-3575.
- Xue, Z., Wu, M., Wen, K., Ren, M., Long, L., Zhang, X. and Gao, G. 2014. CRISPR/Cas9 mediates efficient conditional mutagenesis in *Drosophila*. *Genetics*, 186, 2167-73.
- You, M., Yue, Z., He, W., Yang, X., Yang, G., Xie, M., Zhan, D., Baxter, S. W., Vasseur, L., Gurr, G. M., Douglas, C. J., Bai, J., Wang, P., Cui, K., Huang, S., Li, X., Zhou, Q., Wu, Z., Chen, Q., Liu, C., Wang, B., Li, X., Xu, X., Lu, C., Hu, M., Davey, J. W., Smith, S. M., Chen, M., Xia, X., Tang, W., Ke, F., Zheng, D., Hu, Y., Song, F., You, Y., Ma, X., Peng, L., Zheng, Y., Liang, Y., Chen, Y., Yu, L., Zhang, Y., Liu, Y., Li,

- G, Fang, L., Li, J., Zhou, X., Luo, Y., Gou, C., Wang, J., Wang, J., Yang, H. and Wang, J. 2013. A heterozygous moth genome provides insights into herbivory and detoxification. *Nature Genetic*, 45, 220-5.
- Yu, Z., Ren, M., Wang, Z., Zhang, B., Rong, Y.S., Jiao, R. and Gao, G. 2013. Highly efficient genome modifications mediated by CRISPR/Cas9 in *Drosophila*. *Genetics*, 195, 289-291.
- Zetsche, B., Volz, S. E. and Zhang, F. 2015a. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. *Nature Biotechnology*, 33, 139-42.
- Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., Volz, S. E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., Koonin, E. V. and Zhang, F. 2015b. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 163, 751-771.
- Zhuang, J., Zhang, J., Willers, H., Wang, H., Chung, J. H., van Gent, D. C., Hallahan, D. E., Powell, S. N. and Xia, F. 2006. Checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the fidelity of nonhomologous end-joining. *Cancer Research*, 66, 1401-1408.
- Zhou, H., Liu, B., Weeks, D. P., Spalding, M. H. and Yang, B. 2014. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Research*, 42, 10903-10914.
- Zhou, C., Y. Rao and Y. Rao. 2008. A subset of octopaminergic neurons are important for *Drosophila* aggression. *Nature Neuroscience*, 11, 1059-67